Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Der Einfluss unterschiedlicher Östrogenmengen auf den Serum FSH- u. LH-Spiegel bei intakten und ovarektomierten weiblichen Ratten unterschiedlicher sexueller Reife

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

KLAUS KERN
aus Tübingen

1983

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Der Einfluss unterschiedlicher Östrogenmengen auf den Serum FSH- u. LH-Spiegel bei intakten und ovarektomierten weiblichen Ratten unterschiedlicher sexueller Reife

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

KLAUS KERN
aus Tübingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter :	Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter :	Privatdozent Dr. E. Keller

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	E i n l e i t u n g	1
2.	P r o b l e m s t e l l u n g	6
2.1	Untersuchung der FSH- und LH-Serumspiegel bei intakten und ovarektomierten Tieren verschiedener Altersgruppen nach Östrogengabe.....	6
2.2	Auswirkungen unterschiedlicher Östrogendosen auf die Serumspiegel von FSH und LH.....	6
3.	M a t e r i a l i e n u n d M e t h o d e n ..	7
3.1	Versuchsablauf.....	7
3.2	Versuchstier.....	8
3.3	Ovarektomie.....	8
3.4	Bestimmung der Zyklusphase.....	10
3.5	Stadieneinteilung.....	10
3.6	Serumgewinnung.....	11
3.7	Verwendete Substanzen und Materialien.....	11
3.8	Radioimmunassaymethode - allgemeintheoretische Betrachtungen -	13
3.9	Jodierung des Hormons - Chloramin-T-Methode ..	15
3.10	Nachreinigung.....	15
3.11	Messung der Radioaktivität.....	16
3.12	Test auf Bindung mit dem Antikörper (B_o-Bindung.....	16
3.13	Die Radioimmunassaymethode (speziell)	16
4.	E r g e b n i s s e	20
4.1	20 Tage alte Ratten (Vorpubertät).....	20
4.1.1	Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren.....	20
4.1.2	Serum LH -Spiegel bei intakten Tieren.....	21
4.2	35 Tage alte Ratten (Pubertät).....	21
4.2.1	Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren.....	21
4.2.2	Serum LH -Spiegel bei intakten Ratten.....	22
4.3	56 Tage alte Ratten (gerade reif geworden)....	22
4.3.1	Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren.....	22
4.3.2	Serum LH -Spiegel bei intakten Ratten.....	23
4.4	90 Tage alte Ratten (Reife).....	23
4.4.1	Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren.....	23
4.4.2	Serum LH -Spiegel bei intakten Tieren.....	23

Seite

4.5 20 Tage alte ovarektomierte Ratten (Vorpubertät) 24
4.5.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 24
4.5.2 Serum LH -Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 24
4.6 35 Tage alte ovarektomierte Ratten (Pubertät)... 25
4.6.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 25
4.6.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 25
4.6.2 Serum LH -Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 25
4.7 56 Tage alte ovarektomierte Ratten (gerade reif geworden)..... 26
4.7.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 26
4.7.2 Serum LH -Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 26
4.8 90 Tage alte ovarektomierte Ratten (Reife)..... 26
4.8.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 26
4.8.2 Serum LH -Spiegel bei ovarektomierten Ratten.... 27
4.9. Vergleichende Betrachtungen der gewonnenen Ergebnisse..... 27
4.9.1 Serum FSH- und LH-Spiegel bei intakten Tieren mit den applizierten Dosen I bis III als positiver oder negativer feed-back..... 27
4.9.2 Zusammenstellung der Ergebnisse bei ovarektomierten Tieren für FSH und LH mit den applizierten Dosen I bis III..... 28

5. D i s k u s s i o n 30
5.1 Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich FSH..... 30
5.2 Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich LH..... 30
5.3 Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich FSH 31
5.4 Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich LH 32

6. T a b e l l e n und A b b i l d u n g e n 34

Literaturverzeichnis..... 56

1. Einleitung

Unter dem Begriff Pubertät wird der Zeitraum vom Einsetzen der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale bis zum Erwerb der Fortpflanzungsfähigkeit subsummiert (Gupta et al 1979). Nach Steele (1977) und Steele u. Weisz (1974) ist bei der weiblichen Ratte die Abnahme der Sensitivität von Rezeptoren mit der Pubertät verbunden. Diese Rezeptoren, bei denen es sich um Chemorezeptoren im Hypothalamus handelt, die hauptsächlich auf ovarielles Östradiol ansprechen, setzen dann LH-RH frei. Daraufhin entleert die Hypophyse ihre LH- bzw. FSH-Speicher. Es wird vermutet, daß Östradiol die Hypophyse direkt zur Gonadotropinsynthese und Freisetzung anregt (Ojeda 1976). Die Vermutung, daß Östradiol selbst für den Wechsel der Ansprechbarkeit der Rezeptoren in der Pubertät verantwortlich ist, begründet sich darauf, daß das Alter, in dem diese Veränderung beobachtet wird, durch Östradiolgaben vorgerückt werden kann (Steele and Weisz 1974).

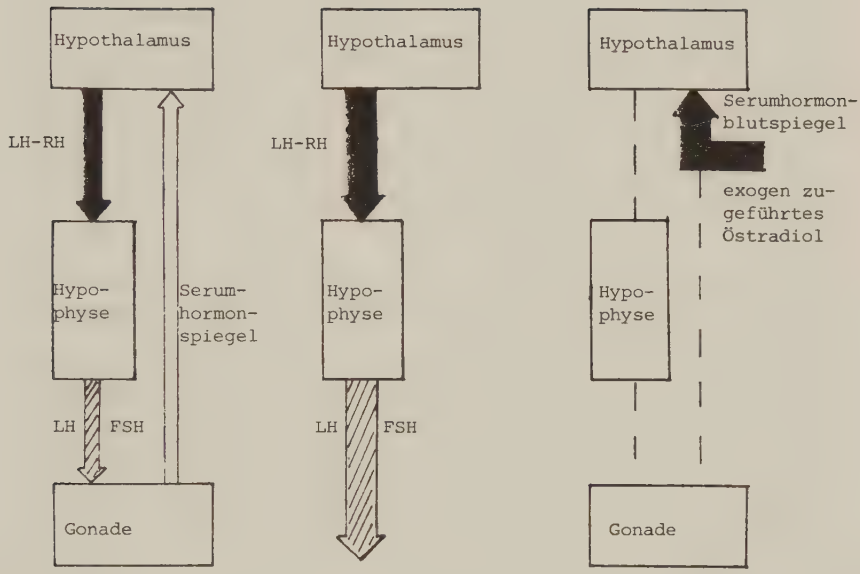
Der Wirkungsmechanismus, der zur Pubertät führt, war lange Zeit unbekannt. Hohlweg und Junkmann (1932) nahmen an, daß für die Hemmung der Gonadotropinsekretion während der Kindheit ein Sexualzentrum im Gehirn verantwortlich sein könnte. Ihre Vermutung war, daß dieses Zentrum die Registrierstelle für die Gonadenhormone darstelle. Mit Beginn der Pubertät, so vermuteten sie, würde sich die Empfindlichkeit dieser Registrierstelle langsam auf ein niedrigeres Niveau einstellen. Sie erklärten sich damit den daraus resultierenden höheren Gonadotropinspiegel. Der gedankliche Zusammenhang Hypothalamus/Hypophyse/Geschlechtsorgan war damit hergestellt.

Der spezielle Zusammenhang von Hypothalamus und Hypophyse blieb bis 1955 offen, als von Harris (1955) nachgewiesen werden konnte, daß die hypothalamische Wirkung durch neurohumorale Regulation über das Pfortadersystem an den Hypo-

physenvorderlappen weitergegeben wurde.

Schally und Mitarbeiter (1967-1968,1970) bezeichneten die Hypothalamushormone als Releasing Hormons, extrahierten sie und wiesen ihre hypophysotrope Wirkung nach. Zur Überprüfung und Relativierung dieser Ergebnisse wurden in der Folgezeit zahlreiche Versuche mit männlichen und weiblichen Versuchstieren durchgeführt (Gupta 1975, 1979, Donovan 1959, Grumbach 1974).

Bei weiblichen Ratten wurden die Gonadotropinspiegel im Serum und in der Hypophyse nach Ovarektomie und bei intakten Tieren bestimmt. Die Ergebnisse bestätigten, daß ein solcher Regelkreis angenommen werden konnte, der in unterschiedlichen Reifestadien auf unterschiedliche Sollwerte eingestellt war.



Walz, S. (1982)

Erläuterungen zum Regelkreis

Zu 1) Unter normalen Verhältnissen herrscht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der inkretorischen Funktion der Hypophyse und der Gonaden. Der "Thermostat", der dieses Gleichgewicht aufrecht erhält, liegt im Hypothalamus.

Zu 2) Nach Ovarektomie entfällt die Bremswirkung der Sexualhormone auf den Hypothalamus. Die Folge davon ist eine vermehrte Bildung von Releasing-Faktoren für FSH und LH.

Zu 3) Die Gabe von Sexualhormon E_2 führt zu einer Bremswirkung auf den Hypothalamus und in der Folge werden weniger Gonadotropine sezerniert.

Als nächstes wurde danach geforscht, in welchem Zeitraum der Gonadostat seine Empfindlichkeit verändert und welche Konsequenzen der Wechsel für die Höhe des Hormonspiegels hatte. Zu diesem Zweck wurden bei weiblichen Ratten die Gonadenhormonspiegel im Serum und in der Hypophyse bestimmt, nach Ovarektomie und bei intakten Tieren. Es zeigte sich, daß bei vorpubertalen, intakten Tieren der Serumhormonspiegel von FSH im Vergleich zu älteren Ratten hoch war. Nach Ovarektomie erhöhte sich dieser Spiegel noch weiter.

Zur Überprüfung des Ovars im Regelkreis wurden die ovarektomierten Tiere mit Östradiol in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Dabei zeigte sich, daß eine geringe Dosis von Östradiol genügt, um die Funktion des Ovars bei vorpubertalen Tieren zu ersetzen. Das absolut gemessene Serum-LH konnte im Vergleich zum Serum FSH durch Östradiol weniger deutlich beeinflußt werden. Es zeigten sich starke individuelle Schwankungen und ein insgesamt pulsativer Verlauf (Keller 1980, Gupta 1980).

Bei pubertären, intakten weiblichen Ratten war der Serum-FSH-Spiegel deutlich niedriger. Auch hier stieg, wie bei den vorpubertalen Ratten, die Serum-FSH-Konzentration nach Ovarektomie an, und konnte ebenfalls durch Östradiol auf Normalwerte zurückgebracht werden. Allerdings war dazu eine höhere Östradiolgabe notwendig. Das Serum-LH verhielt sich ähnlich wie bei den vorpubertalen weiblichen Ratten.

Erwachsene, intakte Ratten wiesen einen zyklusabhängigen Serum-FSH-Spiegel auf, der im sogenannten Diöstrus am niedrigsten war. Untersuchungen zum Zyklus wurden zahlreiche durchgeführt u.a. von Smith (1967), Neill (1973), Steele and Weisz (1974), Yen (1978). Um bei ovarektomierten, erwachsenen Tieren Serum-FSH-Konzentrationen, die dem Level bei intakten Tieren im Diöstrus entsprachen, zu erreichen, waren relativ hohe Östradioldosen notwendig. Es bestätigte sich auch hier, daß die absolut gemessene Menge LH weniger

stark der Östradiolwirkung unterlag, wie die FSH-Konzentration. Es zeigten sich ausgeprägte, individuelle Schwankungen und ein sich pulsativ ändernder Spiegel der tageszeit- und zyklusabhängig war (Steele and Weisz 1974).

Die Frage, weshalb in einem bestimmten Lebensabschnitt (Pubertätsbeginn) dieser Wechsel der Sensitivität des Gonadostaten stattfindet, blieb bis auf das Mitwirken extrahypothalamischer Einflüsse bisher ungeklärt. Als extrahypothalamische Einflüsse sind zum Beispiel Umwelteinflüsse, Ernährungszustand, Stress, chronologisches Alter, anzusehen (Gupta 1976, Gupta und Voelter 1978, Negro-Vilar 1973, Steele and Weisz 1974, Goldberg 1972, Merk 1972).

Gezielte Untersuchungen zum Regelkreis Hypothalamus/Hypophyse/Sexualorgan ergaben: Stimulation mit unterschiedlichen Östradiolkonzentrationen ruft im Hypothalamus hemmende bzw. fördernde Wirkung auf die Freisetzung von LH-RH und folglich auf die Hypophyse hervor.

Ein positiver und ein negativer feedback-Mechanismus müssen angenommen werden (Steele and Weisz 1974 u. 1977, Andrews und Ojeda 1977). Mit dem positiven feedback-Mechanismus wurden auch in einigen Studien die Hormonverhältnisse bei unreifen Tieren erklärt (hohe FSH- und LH-Spiegel als Level) (Dohler, Wuttke 1972, Christchlow 1967, Andrews und Ojeda 1977).

Obwohl der Regelkreis als eine gesicherte Erkenntnis feststeht, darf nicht versäumt werden daran zu denken, daß es sich hier um einen Systemkomplex ineinandergreifender Faktoren handelt, die nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können.

2. Problemstellung

2.1 Untersuchung der FSH- und LH-Serumspiegel bei intakten und ovarektomierten Tieren verschiedener Altersgruppen nach Östrogengabe.

2.2 Auswirkungen unterschiedlicher Östrogendosen auf die Serumspiegel von FSH und LH.

3. Materialien und Methoden

3.1 Versuchsablauf

Gruppe 1 - Intakt

Allen Altersgruppen wurden intraperitoneal NaCl injiziert, anschließend wurde der Serum FSH- und LH-Spiegel bestimmt (bei adulten und adoleszenten Ratten unter Beachtung der Zyklusphasen).

Gruppe 2 - Ovarektomiert

Alle Tiere jeder Altersstufe wurden ovarektomiert, anschließend erfolgte die NaCl-Injektion. Danach wurde wiederum FSH und LH im Serum bestimmt.

Gruppe 3 - Intakt + E_2

Alle Altersgruppen erhielten in einer bestimmten Zyklusphase Östradiolinjektionen verschiedener Konzentrationen
(Dosis 1 = 0,2 mg/100 g KG,
Dosis 2 = 1,0 mg/100 g KG,
Dosis 3 = 5,0 mg/100 g KG).
8 Stunden nach Östrogengabe wurden die Tiere dekapitiert. Der Serumhormonspiegel wurde bestimmt.

Gruppe 4 - Ovarektomiert + E_2

Die Tiere wurden ovarektomiert und anschließend mit den vorher genannten Konzentrationen von Östradiol gespritzt. Die Östradiolgabe erfolgte, als der Gonadotropinspiegel am höchsten war. Durch die pilot-study von Roseline Hipp konnte als der Höhepunkt des Gonadotropinspiegels bei den 20- und 35-tägigen Ratten der dritte Tag nach der Ovarektomie und bei den 56- und 90-tägigen Ratten der vierte Tag nach Ovarektomie bestimmt werden.

3.2 Versuchstiere

Zu der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Ratten des Wistar-Stammes aus der Versuchstieranstalt Dr. Ivanovas, Kißlegg (Allgäu) als Versuchstiere herangezogen. Die Tiere waren in Gemeinschaftskäfigen in 5er-Gruppen untergebracht. Es bestanden keine Einschränkungen bezüglich der Ernährung. Die Raumtemperatur betrug 20° C. Von 6^{00} Uhr morgens bis 10^{00} abends wurde der Raum, in dem sich die Tiere befanden, künstlich beleuchtet. Für alle Tiere war eine Adaptionszeit von 4 Tagen vorgesehen. Aufgrund der Problemstellung waren die Ratten

20 Tage (vorpubertät
35 Tage (Pubertät)
56 Tage (gerade der Pubertät entwachsen)
90 Tage (Reife)

alt, als sie zu den folgenden Versuchen herangezogen wurden.

3.3 Ovarektomie

Das Ovar - anatomische Verhältnisse

Die linsenförmigen Ovarien haben eine unregelmäßige, knotige Oberfläche. Im Frischpräparat haben sie eine rötliche Farbe. Ein einzelnes, ausgewachsenes Ovar wiegt ca. 60 mg und mißt 4 x 4 x 3 mm (Fränkel 1905, Drahn 1926, Preissecker 1931, Schuhmacher 1973).

In situ befindet sich das rechte Ovar am lateralen Rand des M. psoas major in Höhe von L_4 bis L_6 der Wirbelsäule und 7 bis 12 mm caudal der Niere. Das linke Ovar liegt in Höhe L_5/L_6, 3 bis 5 mm caudal der Niere und ebenso entlang des lateralen Randes des M. psoas major.

Das linke Ovar findet man ungefähr 11 mm von der Medianlinie entfernt, im Gegensatz zu 15 mm des rechten Ovars.

Das Ovar ist von einem einfachen Zylinderepithel bedeckt welches am Hilus in das Plattenepithel der Bursa ovarica übergeht. Die Tunica albuginea ist 5 bis 16 um dick.

Operationsvorgang

Nach 4 Tagen Adaptionszeit im Tierstall der Universitätskinderklinik Tübingen, bei definierten Bedingungen, wurden die Ratten unter Äthernarkose ovarektomiert.

Da die Ratten ein außerordentliches Properdinsystem besitzen, waren keine aseptischen Operationsbedingungen erforderlich. Die Ratten wurden so lange in ein Standglas mit Deckel, in dem sich ein Ätherluftgemisch befand, gesperrt, bis sie in das Narkosestadium III = Toleranzstadium, kamen.

Vor dem Eingriff wurden die Ratten gewogen und mit wasserfestem Filzstift am Ohrläppchen markiert.

Das Toleranzstadium wurde während des gesamten Operationsvorgangs aufrecht erhalten, in dem man den Ratten einen in Äther getränkten Wattebausch unter die Schnauze legte. Wichtig war, die Atmung genau zu überwachen, um bei Atemstillstand sofort mit einer Fahrradluftpumpe reanimieren zu können.

Der Zugang zu den Ovarien erfolgte von dorsal her. Ein Hautschnitt längs der Mittellinie in Höhe L_4 bis L_6 der Wirbelsäule wurde gesetzt. Die Haut wurde zuerst nach links vom M. rectus abdominalis freipräpariert bis zum lateralen Rand des M. psoas major. Hier wurde eine helle Stelle sichtbar, bei der es sich um durchscheinendes Fettgewebe handelte, in welches die Ovarien eingebettet waren.

Mit einem kleinen Schnitt durch die Fascie des M. rectus abdominalis wurde die Bursa ovarica eröffnet. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde das Ovar gefaßt und herausgezogen. Das Abbinden der Tube erfolgte mit Ethilon-Faden. Oberhalb der Ligatur wurde das Ovar abgesetzt und der Stumpf reponiert. Da die Ovarektomie ein verhältnismäßig unblutiger Eingriff war, war es nicht nötig, den Schnitt im M. rectus abdominalis durch eine Naht zu verschließen.

Unter Beachtung der anatomischen Seitendifferenz wurde der Eingriff auf der rechten Seite wiederholt. Der Hautschnitt wurde vernäht und die Ratte in den Käfig zurückgelegt.

Durch laufende Beobachtung stellte sich heraus, daß es nötig war, die ovarektomierten von den intakten Tieren zu trennen, da diese die Wunden anfraßen bzw. die ovarektomierten Ratten fast ganz auffraßen.

Die operierten Ratten erholten sich sehr schnell von der Narkose und der Operation.

3.4 Bestimmung der Zyklusphase

Zur Bestimmung der Zyklusphase, in der sich die Ratte gerade befand, wurde bei allen Altersgruppen, unter Zuhilfenahme eines Q-Tip-Stäbchens, ein Abstrich der Vagina vorgenommen, auf einen Objektträger gebracht, 10 Minuten mit Eosinrot, nach Abwaschen 10 Minuten mit Hämalaun, gefärbt und anschließend getrocknet. Mittels eines Lichtmikroskops konnte anhand einer Vorlage die Zyklusphase bestimmt werden. Befanden sich die Tiere im Diöstrusstadium konnte die Östradiolinjektion erfolgen.

3.5 Stadieneinteilung

I. Stadium: Proöstrus (Vorbereitungszeit) Dauer etwa 12 Stunden

II. Stadium: Östrus (eigentliche Brunst) Dauer etwa 10 bis 18 Stunden

III. Stadium: Metöstrus I (abklingen der Brunst) Dauer etwa

IV. Stadium: Metöstrus II 24 bis 30 Stunden

V. Stadium: Diöstrus (Ruhestadium) Dauer etwa 50 bis 60 Stunden

3.6 Serumgewinnung

An definierten Tagen wurden die mit Äther betäubten Ratten zwecks Blutentnahme mit einer Schere dekapitiert. Das Blut wurde unter Zuhilfenahme eines Trichters in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Danach blieb das Blut mindestans eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur zur Gerinnung stehen. Anschließend wurde es 10 Minuten in einer Tischzentrifuge (Fa. Christ Typ UJ 2) bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde dann sofort abpipetiert und bei -20° C bis zum Radioimmunassay (RIA) aufbewahrt.

3.7 Verwendete Substanzen und Materialien

Faden: Ethilon FS-2
EH 7506

Nadelhalter
Chirurgische Schere
Chirurgische und anatomische Pinzetten
Eosinrot (Abstrichfärbung)
Hämalaun (Abstrichfärbung)
Objektträger

Fa. MERCK, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6580
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6345
Natriumchlorid	Nr. 6404
Kaliumjodid Neutral	Nr. 5043
Äthylendinitrilotetraessigsäure	Nr. 8436
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426
Natriumphrosulfit	Nr. 6528
Chloroform	Nr. 2445
Bromphenolblau	Nr. 8122
Äther (Narkose)	Nr. 921

Fa. SERVA-Feinbiochemika, Heidelberg
Saccharose reinst Nr. 35580
Äthylmercurithiosalicylsäure Nr. 11375

BERINGWERKE, Marburg/Lahn
Rinderserumalbimin

WELLCOME Reagents Ltd., Beckenham, England
Rabbit Serum inactivated
Precipitatin Serum for Radio-immunoassay
(Anti-Rabbit Gamma-Globulin)

RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham
Jod - 125 (Na-Salz) IMS. 30

NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DESSEASES AND DISORDERS (NIAMDD), Bethesda MD., USA
Purified Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Rat LH-I-3)
antiserum to Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat LH-RP-1)
Purified Rat Fillicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Rat FSH-I-1)
Antiserum to Rat Fillicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat FSH-Serum-6)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat FSH-RP-1)

FARBWERKE HOECHST AG, Frankfurt-Hoechst
Synthetisches LH-RH

Elutionspuffer für die Jodierung: pH 7,6
13,2 ml 0,1 M $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
+ 86,8 ml 0,1 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
+ 8,7 g NaCl = 0,15 M
+ 100 mg Merthiolat = 0,01 %
ad 1 l H_2O dest. = 0,01 M Phosphatpuffer
Diulent: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung
+ 1 % Rinderserumalbumin
Stammpuffer pH 7,6

3,45 g $NaH_2PO \times 2H_2O$
+ 0,8737 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
pH Angleich mit 1 N NaOH
ad 500 ml H_2O dest.

Assaypuffer: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung
+ 18,6 g EDTA
+ 3,0 ml Rabbitserum
ad 1 l H_2O dest.

Transferlösung:
1 % KJ
+ 16 % Sucrose in P 1
+ Bromphenolblau (Spur)
2 % BSA Lsg.:
2 g Rinderserumalbumin in Elutionspuffer für die Jodierung

3.8 Radioimmunassaymethode - allgemeintheoretische Betrachtungen -

Die aus mehreren verschiedenen Amminosäurebausteinen aufgebauten Proteohormone sind im eiweißhaltigen Milieu, wie dem Blutplasma mangels spezifischer Gruppen nicht bestimmbar. Ganz im Gegensatz zu den Steroidhormonen (wie zum Beispiel Corticosteroide, Gestagene (C_{21}-Steroide) Antrogene (C_{19}-Steroide) Östrogene (C_{18}-Steroide), die aus den Körperflüssigkeiten extrahiert, gereinigt und dann mit analytischen Reagenzien in spezifischen Reaktionen nachgewiesen werden können.

Die Radioimmunassaymethode ist wie folgt aufgebaut:
In einem immunologischen System wird das Antigen von einem hochspezifischen globulären Proteinmolekül, dem Antikörper, erkannt und in einem Komplex aus beiden Molekülen gebunden.

Bei der Bestimmung von physiologischen Konzentrationen von Proteohormonen wird die Austauschbarkeit eines (z.B. radioaktiv) markierten Antigens im Antigen-Antikörper-Komplex durch ein unmarkiertes Antigen ausgenutzt. Es besteht ein Wettbewerb zwischen "kaltem" unmarkiertem Hormon und radioaktiv markiertem Hormon um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers.

^{125}J - Hormon (F) ^{125}J - Hormon - Ab (B)
\+ + Antikörper +
"kaltes" Hormon "kaltes" Hormon - Ab

Durch hinzufügen von "kaltem" Hormon wird das Verhältnis von freiem, markiertem Hormon (F) zu gebundenem markiertem Hormon (B) zugunsten von freiem markiertem Hormon (F) verschoben. B : F wird kleiner.

Für die mengenmäßige Bestimmung eines Hormons in einer Probe wird mit einem zweiten Ansatz verglichen, in welchem Standardverdünnungen mit bekannten Mengen von unmarkiertem Hormon eingesetzt werden.

Das Ergebnis dieses zweiten Ansatzes, die mit größer werdenden Konzentrationen von kaltem Hormon kleiner werdenden Verhältnisse B : F, wird graphisch aufgetragen: Man erhält die Standardkurve.

3.9 Jodierung des Hormons - Chloramin-T-Methode -

Reihenfolge des Pipettierens bei der Jodierung:

1. 2 ug (normalerweise in 20 ul Puffer) des Hormons
2. 20 ul des 0,5 M Phosphatpuffers
3. 0,5 mCi (entsprechen normalerweise 5 ul Lösung)
4. 10 ul Chloramin T (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)
5. Reaktionszeit 1 Minute; dabei auf einem Schüttelgerät (Typ Rotamixer, Fa. Hock + Tucker HT) schütteln.
6. 30 ul Natriumpyrosulfit (125 mg in 50 ml 0,01 M Phospahtpuffer gelöst)
7. 100 ul Transferlösung
8. Übertragung des Reaktionsgemisches auf die Sephadexsäule (G-75-Füllung)
9. Reaktionsgefäß mit 2 mal 20 ul 2 % BSA Lösung nachspülen und ebenfalls auf die Sephadexsäule übertragen.
10. Sephadexsäulenfüllung mit 0,01 M Phosphatpuffer eluieren
11. Fraktionen von je 1 ml sammeln (Vorlage: 0,5 ml 2 % BSA Lösung)

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich die Elutionskurve.

Der Hauptpeak stellt das radioaktiv markierte Hormon dar, während der zweite peak, Salzpeak genannt, Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen sowie freies radioaktives Jod darstellt.

3.10 Nachreinigung

Herstellen einer Sephadexsäule (G-200) Füllhöhe ca. 30 bis 35 cm. Der Inhalt von zwei bis drei Röhrchen des peak I der Elution nach der Jodierung werden aufgetragen und mit 0,01 M Phospahtpuffer eluiert (Tropfgeschwindigkeit ca. zwei Tropfen pro Minute). Zur Verminderung der Adsorption

an der Glaswand des Auffang-Röhrchens wurde eine Spatelspitze BSA-Pulver vorgegeben. Der Inhalt von vier bis fünf Röhrchen des peak I der ersten Nachreinigung wurden einer zweiten derartigen Reinigung unterworfen.

3.11 Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde in einem Gamma-Zähler (Typ Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer Nr. 5160) wie folgt gemessen: Die ausgestrahlten Impulse wurden über einen Zeitraum von 200 Sekunden hinweg registriert und als Counts gezählt. Die Summe der ständig registrierbaren Strahlen wurde als background von jedem Meßergebnis der Proben subtrahiert.

3.12 Test auf Bindung mit dem Antikörper (B_0-Bindung)

Da das radioaktive Hormon durch den Markierungsprozeß und vielerlei anderen physikalischen und chemischen Ereignissen denaturiert bzw. immunologisch verändert sein kann, ist ein Test auf die immunologische Funktionsfähigkeit nötig.

Als B_0-Bindung bezeichnet man die Bindung an den Antikörper, die in der nicht kompetitiven Situation, also ohne die Anwesenheit des "kalten" Hormons gefunden wird. Diese B_0-Bindung ist konzentrationsabhängig.

3.13 Die Radioimmunoassay-Methode (speziell)

Im wesentlichen wurden die vom National Institute of Health/ Bethesda Md., USA gegebenen Richtlinien übernommen.

Die folgenden Schritte wurden der Reihenfolge nach durchgeführt:

1) Plastik Reagenzröhrchen zum einmaligen Gebrauch wurden als Assayröhrchen verwendet.

2) Diluent (in genügender Menge für ein Gesamtreaktionsvolumen von 800 ul) wurde zugegeben.

3) a. Weiter wurde zugegeben das zu untersuchende Serum (100 bzw. 200 ul) oder
   b. die Standardverdünnung der Reference Preparation von 500 ng bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen, daß eine Standardkurve gezeichnet werden konnte.

4) Zugabe von 200 ul des Antiserums gegen das jeweils zu messende Hormon in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 10 000 bis 1 : 15 000 in mit 3 % normalem rabbit-Serum versetzten Phosphatpuffer.

5) Dieses Gemisch wurde auf einem Rotamix-Schüttler kurz aufgeschüttelt und 24 Stunden bei 4° C inkubiert.

6) 100 ul jodiertes Hormon in einer Verdünnung von 40.000 counts pro 200 Sekunden wurde dazugegeben.

7) Nach kurzem Schütteln des Reaktionsgemisches wurde 24 Stunden bei 4° Celsius inkubiert.

8) Nach dieser Zeit wurden 200 ul genügend (meist 1:12) verdünntes Anti-rabbit-gamma-Globulin dazugegeben, um die maximale Präzipation des an den Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen. Verdünnung mit 0,01 molarem Phosphatpuffer.

9) Nach kurzem Schütteln des Gemisches wurde 3 Tage bei 4° Celsius inkubiert.

10) Zentrifugation bei 2000 x g für 2 Stunden. Der Überstand wurde abgekippt. Das Präzipitat in einem Packard bzw. Tracerlab Gammazähler gezählt.

11) Die Röhrchen mit den unbekannten Mengen des Hormons wurden mit den counts der Standardverdünnung der Reference Preparation verglichen. Dazu wurde graphisch eine Kurve dieser Standardwerte konstruiert und die Werte der unbekannten Proben direkt aus dieser Kurve abgelesen oder mittels Lochstreifen im Computer ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als ng NIAMDD-Rat LH-RP-1 bzw. ng NIAMDD-Rat FSH-RP-1 per ml Serum ausgedrückt.

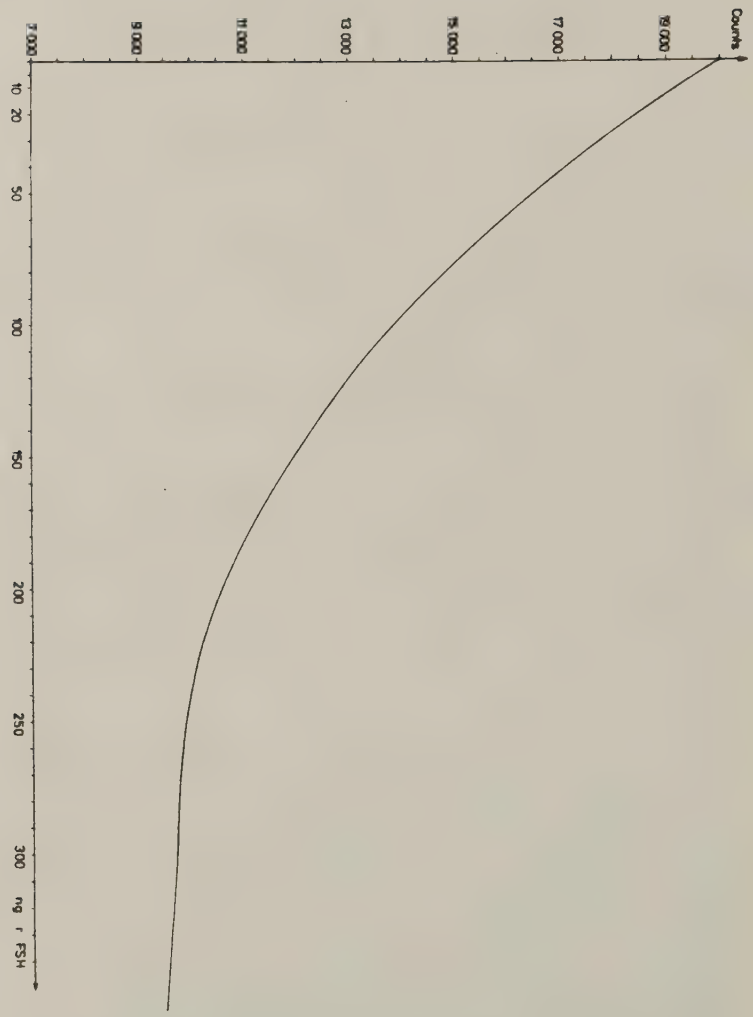


Abb. 17 Standardkurve für FSH

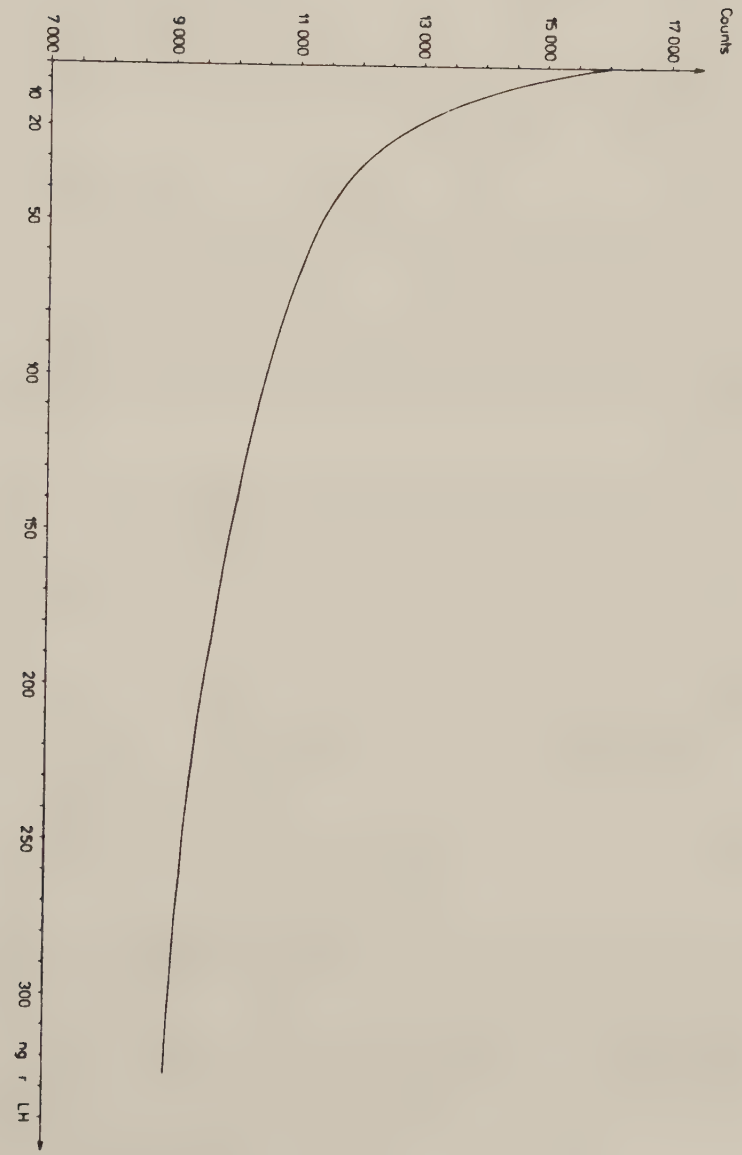


Abb. 18 Standardkurve für LH

4. Ergebnisse

Aus den Tabellen und Schaubildern ist abzulesen, daß die exogene Zufuhr von Östradiol in den Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Ovar den Serumhormonspiegel von FSH und LH verändert.

Beim Fehlen eines Gliedes im Regelkreis (hier: Ovarektomie) kann bei exogener Zufuhr von Östradiol in verschiedenen Konzentrationen teilweise die Annäherung an die physiologischen FSH- und LH-Serumwerte beobachtet werden.

Es folgen vergleichende Betrachtungen innerhalb der verschiedenen Altersstufen bei intakten und ovarektomierten Ratten und drei verschiedenen exogen zugeführten Dosen Östradiol:

Dosis I ≙ 0,2 ug/100 g Körpergewicht
Dosis II ≙ 1,0 ug/100 g Körpergewicht
Dosis III ≙ 5,0 ug/100 g Körpergewicht

4.1 20 Tage alte Ratten (Vorpubertät)

4.1.1 Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren (Abb.: 1, 2, 3, 7)

Von dem Basiswert 800 ng/ml ist 8 Stunden nach der Substitution mit Dosis I eine Abnahme auf 320 ng/ml, bei Dosis II auf 635 ng/ml und bei Dosis III auf 610 ng/ml zu beobachten.

Mit einem Abfall um 91 % zeigen die Tiere mit der kleinsten applizierten E_2-Dosis (D I) die stärkste Reaktion. Nach der Gabe von Dosis II und Dosis III kommt es zu einem annähernd gleichen Abfall des FSH-Serumspiegels um 21 bzw. 24 %

4.1.2 Serum LH-Spiegel bei intakten Tieren
(Abb.: 4, 5, 6, 8)

Der LH-Spiegel ändert sich von 60 ng/ml nach 8 Stunden wie folgt: Bei Dosis I Abnahme auf 5 ng/ml, bei Dosis II Zunahme auf 150 ng/ml und bei Dosis III wieder Abnahme auf 20 ng/ml.

Bei Gabe von Dosis I und Dosis III kommt es zu einem Abfall um 91 % bei Dosis I und um 66 % bei Dosis III. Auf Dosis II hingegen steigt der Blutspiegel auf 150 %.

Bezüglich LH zeigen die vorstehenden Ergebnisse, daß dieses einheitliche Bild wie bei FSH bei LH nicht festzustellen ist.

Auf die hohe Dosis III reagieren alle Tiere mit einem negativen feed-back. Auf die kleinere Dosis E_2 reagieren nur die 90 Tage alten Tiere mit einem positiven feed-back. Dies spricht wiederum dafür, daß bei reifen Tieren ein negativer feed-back durch einen positiven feed-back ersetzt wird.

Im Falle der mittleren Dosis reagieren die 20- und 35-Tage alten Ratten mit einem Anstieg des Serumwertes auf die E_2-Gabe, ebenso die 90-tägigen Tiere. Nur die 56 Tage alten reagieren mit einem negativen feed-back.

4.2 35 Tage alte Ratten (Pubertät)

4.2.1 Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren
(Abb.: 1, 2, 3, 7)

Bei Dosis I ist nach 8 Stunden kein meßbares FSH mehr vorhanden. Bei Dosis II beträgt die Abnahme 150 ng/ml auf 25 ng/ml und bei Dosis III ist ebenfalls wie bei Dosis I kein Serum FSH meßbar.

Es kommt bei Dosis I und Dosis III zu einem 100%igen Abfall der Serumkonzentrationen. Nach Gabe von Dosis II fällt der Hormonwert um 85 %.

4.2.2 Serum LH-Spiegel bei intakten Ratten
(Abb.: 4, 5, 6, 8)

Vom Basiswert 30 ng/ml fällt die Konzentration bei Dosis I auf 11 ng/ml, steigt bei Dosis II geringfügig auf 35 ng/ml an und nimmt bei Dosis III bis auf 5 ng/ml ab. In Prozenten gesehen bedeuted dies einen Abfall des Hormonspiegels nach Gabe von Dosis I um 63 %, nach Gabe von Dosis II um 83 %. Die mittlere E_2-Dosis führte dagegen zu einem geringfügigen Anstieg um 16 %.

4.3 56 Tage alte Ratten (gerade reif geworden)

4.3.1 Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren
(Abb.: 1, 2, 3, 7)

Bei den 56 Tage alten Ratten ist im Gegensatz zu den 90 Tage alten Tieren bei allen drei Dosisgrößen ein Abfall der Serumkonzentration zu sehen:

bei Dosis I von 110 ng/ml auf 10 ng/ml
bei Dosis II von 110 ng/ml auf 7 ng/ml und
bei Dosis III von 110 ng/ml auf 58 ng/ml.

Bei einem Abfall des FSH-Spiegels um 90 % nach Gabe von Dosis I und von 93 % nach Gabe von Dosis II zeigt sich, daß beide Dosen bei dieser Altergruppe einen nahezug identischen feed-back-Effekt bewirken.

Die höhere Dosis III bewirkt jedoch nur einen Abfall um 47 % des Ausgangswertes. Hieraus ist zu schließen, daß die höhere Dosis eine weniger ausgeprägte Hemmwirkung auf die hypophysäre FSH-Abgabe hat wie die niedrigeren Dosen.

4.3.2 Serum LH-Spiegel bei intakten Ratten
(Abb.: 4, 5, 6, 8)

Es ist eine Abnahme des Serum LH-Spiegels bei Dosis I von 10 ng/ml auf 8 ng/ml nach 8 Stunden zu sehen. Bei Dosis II von 10 ng/ml auf 0 ng/ml und bei Dosis III von 10 ng/ml auf 2 ng/ml. Betrachtet man die prozentualen Werte, so zeigt sich, daß sich im Falle des LH die Östrogengabe bei Dosis II am stärksten auswirkt. Es kommt zu einem Abfall des Hormonspiegels um 100 %. Die höhere Dosis III bewirkt einen Abfall um 85 %, Dosis I nur um 20 %.

4.4 90 Tage alte Ratten (Reife)

4.4.1 Serum FSH-Spiegel bei intakten Tieren
(Abb.: 1, 2, 3, 7)

8 Stunden nach E_2-Gabe ist der FSH-Serumspiegel bei Dosis I von 100 ng/ml auf 13 ng/ml gefallen, während er bei Substitution der Dosis II von 100 ng/ml auf 240 ng/ml angestiegen ist. Bei Gabe der Dosis III ist nur ein geringer Anstieg von 100 ng/ml auf 108 ng/ml zu verzeichnen.

Prozentual gesehen zeigen diese Serumwerte nach Gabe der kleinsten Dosis E_2 einen Abfall von 87 %, bei Dosis II steigt der Hormonspiegel um 140 %, bei Dosis III dagegen nur um 8 %.

Es ist zu diskutieren, ob bei dieser Altersgruppe die unterschiedlichen Östrogenmengen auch unterschiedliche feed-back-Mechanismen auslösen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Gabe einer kleinen Menge Östrogen einen negativen, die Gabe einer größeren Menge E_2 dagegen einen positiven feed-back auslöst. Bei Dosis III ist der Anstieg von 8 % zu vernachlässigen und daraus folgend keine feed-back-Wirkung zu erkennen.

4.4.2 Serum LH-Spiegel bei intakten Tieren
(Abb.: 4, 5, 6, 8)

Beim Serum LH-Spiegel ist bei Dosis I ein Anstieg um rund das Eineinhalbfache, bei Dosis II um das Fünfzehnfache und bei Dosis III ein Abfall um die Hälfte zu verzeichnen. Diese Ergebnisse zeigen, daß auch hier die mittlere Dosis den größten positiven feed-back zwischen Östrogen und hypophysärem LH bewirkt. Es kommt zu einem Anstieg der Serumkonzentrationen um 1400 %. Die kleinere Dosis führt dagegen nur zu einem Anstieg von 150 %. Während bei Dosis I und Dosis II ein positiver feed-back erkennbar ist, ist nach Gabe von Dosis III als Ausdruck eines negativen feed-backs ein Abfall des Serumspiegels von 50 % zu verzeichnen.

4.5 20 Tage alte ovarektomierte Ratten (Vorpubertät)

4.5.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten
(Abb.: 9, 10, 11, 15)

Nach 8 Stunden ist bei allen drei Dosen eine Abnahme des Serum FSH-Spiegels vorhanden. Bei Dosis I von 2500 ng/ml auf 1550 ng/ml, bei Dosis II auf 600 ng/ml und bei Dosis III auf 1700 ng/ml.

Die größte Abnahme sieht man mit 76 % bei Dosis II, während bei der kleinsten Konzentration ein Abfall von 38 % und bei der größten ein ähnlich hoher Abfall um 32 % errechnet wurde.

4.5.2 Serum LH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten
(Abb.: 12, 13, 14, 16)

Fast konform zum FSH-Spiegel ist eine Abnahme bei Dosis I von 550 ng/ml auf 170 ng/ml, bei Dosis II von 550 ng/ml auf 0 ng/ml und bei Dosis III von 550 ng/ml auf 140 ng/ml zu sehen.

bei den 56 Tage alten Tieren zu einem wohl zu vernachlässigenden Abfall der LH-Konzentrationen. Dosis III führt in jedem Alter zu einem negativen feed-back. Die reifen Tiere unterscheiden sich wiederum in ihrer Antwort auf die Östrogengabe von den sich in der Pubertät befindlichen bzw. infantilen Tieren. Sie reagieren auf die Gabe der beiden niedrigen Östrogendosen mit einem Anstieg der LH-Serumkonzentration. Die hohe E_2-Dosis führt ebenfalls zu einem Abfall. Man kann hieraus schließen, daß die reifen Tiere wesentlich empfindlicher auf die Östrogengabe reagieren, sodaß schon kleine Hormonmengen zu einer hypophysären LH-Ausschüttung führen. Es zeigt sich hier, wie beim FSH ein unterschiedliches Sekretionsmuster in Abhängigkeit von der Menge des zugeführten E_2. Während die mittlere Dosis zu einem Anstieg des LH-Spiegels führt, bewirkt die hohe Dosis einen Abfall desselben.

Hier ist wieder auf die Steuerung des Zyklus durch die unterschiedlichen Hormonkonzentrationen hinzuweisen. So liegt im Proöstrus der reifen Ratte zur Zeit des Östrogenmaximums ein sehr niedriger FSH und LH-Spiegel vor, während die Östrogenwerte abfallen, kommt es dann zu einem Anstieg des FSH und LH zu ihren peaks.

5.3 Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich FSH

Auch bei den ovarektomierten Tieren stellt man in Abhängigkeit von der gegebenen E_2-Menge unterschiedliche hypophysäre Reaktionen fest. Die jüngsten Tiere reagieren noch bei keiner der gegebenen Dosen mit einem Anstieg des FSH-Spiegels. Hieraus ist zu schließen, daß bei diesen Tieren noch kein positiver feed-back zwischen Östrogen und FSH-Abgabe vorhanden ist. Dies bestätigt die Ergebnisse, die wir bei den intakten Tieren erhielten.

Im Gegensatz zum intakten Zustand zeigen die kastrierten älteren Tiere nach der Gabe der Dosis I und II einen posi-

tiven feed-back. Dies führt zu der Vermutung, daß der Östrogenentzug infolge der Kastration zu einer vermehrten hypophysären Sensibilität für das exogen zugeführte E_2 geführt hat.

Während bei den 90 Tage alten reifen Tieren dieser positive Effekt auch bei der größten Dosis E_2 ausgelöst werden konnte, zeigten die 35 und 56 Tage alten Tiere bei dieser hohen E_2-Dosis einen negativen feed-back. Daraus könnte man schließen, daß erst mit Eintritt der vollen Reife der Tiere der positive feed-back voll ausgeprägt ist und nicht mehr von der Menge des exogen zugeführten Östrogens bestimmt wird. Dies findet wiederum Übereinstimmung mit den bei den intakten Tieren gewonnenen Ergebnissen, welche ebenfalls erst im Alter von 90 Tagen einen positiven feed-back bei der hohen E_2-Dosis aufweisen.

5.4 Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich LH

Im Gegensatz zu allen vorherigen Ergebnissen, zeigen die kastrierten Tiere trotz der zugeführten E_2-Menge, unabhängig von Dosis und Alter, einen Abfall der Serum-LH-Werte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß das gegebene Östrogen durch das östrogenbindende Globulin abgefangen wird, und somit nicht für eine positve feed-back-Wirkung zwischen dem Hormon und der hypophysären LH-Abgabe zur Verfügung steht.

Das Vorhandensein eines spezifischen östrogenbindenden Alpha-Foeto-Proteins im fetalen und präpubertalen Alter wurde von Nunez nachgewiesen (Nunez et al 1971).

Aus den gewonnenen Ergebnissen ist zu schließen, daß dieses Protein auch noch bei den älteren Tieren eine Rolle spielt.

Der LH-Abfall nach der Gabe einer kleinen Östrogenmenge steht im Gegensatz zu den von Labrie et al (1978) gewonne-

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß bei Dosis I bis Dosis III ein positiver feed-back vorhanden ist. Die kleinste Dosis hat dabei die größte Steigerung mit 97 %, die mittlere Dosis II die kleinste Steigerung mit 20 % und die größte Dosis III eine Steigerung von 36 % zu verzeichnen.

4.8.2 Serum LH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten
(Abb.: 12, 13, 14, 16)

Bei Substitution von E_2 der Dosis I ist ein Abfall von 160 ng/ml auf 120 ng/ml, bei Dosis II auf 100 ng/ml und bei Dosis III auf 90 ng/ml festzustellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß alle drei Dosen einen negativen feed-back zwischen E_2 und hypophysärem LH bewirken. Der stärkste Abfall ist bei Dosis III mit 44 % fast gleich mit dem Abfall bei Dosis II, nämlich mit 38 % zu sehen. Die kleinste Dosis I hat den kleinsten Abfall der Serumkonzentration mit 25 %.

4.9 Vergleichende Betrachtungen der gewonnenen Ergebnisse

4.9.1 Serum FSH- und LH-Spiegel bei intakten Tieren mit den applizierten Dosen I bis III als positiver oder negativer feed-back

	FSH		
Alter der Tiere	Dosis I	Dosis II	Dosis III
20 Tage	neg.	neg.	neg.
35 Tage	neg.	neg.	neg.
56 Tage	neg.	neg.	neg.
90 Tage	neg.	pos.	pos.

	LH		
Alter der Tiere	Dosis I	Dosis II	Dosis III
20 Tage	neg.	pos.	neg.
35 Tage	neg.	pos.	neg.
56 Tage	neg.	neg.	neg.
90 Tage	pos.	pos.	neg.

Die vorstehenden Ergebnisse bezüglich FSH zwigen, daß bei allen Altersgruppen bei der Gabe einer niedrigen Dosis E_2 ein negativer feed-back zwischen Hypophyse-Hypothalamus und Östrogen zu verzeichnen ist. Bei den jüngeren Tieren ist dieser negative feed-back auch bei höheren E_2-Dosen festzustellen. Erst im Alter von 90 Tagen bewirken diese hohen Dosen (D II und D III) einen positiven feed-back im obengenannten Regelkreis. Es ist somit anzunehmen, daß es beim Älterwerden der Tiere zu einer Reifung der hypophysär-gonadalen Achse kommt, dahingehend, daß der negative feed-back zu einem positiven feed-back wird.

4.9.2 Zusammenstellung der Ergebnisse bei ovarektomierten Tieren für FSH und LH mit den applizierten Dosen I bis III

	FSH		
Alter der Tiere	Dosis I	Dosis II	Dosis III
20 Tage	neg.	neg.	neg.
35 Tage	pos.	pos.	neg.
56 Tage	pos.	pos.	neg.
90 Tage	pos.	pos.	pos.

	LH		
Alter der Tiere	Dosis I	Dosis II	Dosis III
20 Tage	neg.	neg.	neg.
35 Tage	neg.	neg.	neg.
56 Tage	neg.	neg.	neg.
90 Tage	neg.	neg.	neg.

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist, zeigen die 20 Tage alten Tiere bei keiner der drei gegebenen Dosen eine Reaktion bezüglich ihrer FSH-Ausschüttung. Die älteren Tiere zeigen dagegen einen Anstieg bzw. keine Veränderung des FSH-Serumspiegels nach der Gabe von Dosis I und Dosis II, nur bei den 90-tägigen Tieren kommt es zu keinem Abfall des Hormonwertes nach der Gabe von Dosis III.

Dagegen kommt es im Falle des LH bei allen ovarektomierten Tieren unabhängig vom Alter und der gegebenen Östrogenmenge zu einem Abfall der LH-Hormon-Konzentrationen.

5. Diskussion

5.1 Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich FSH

Ein negativer feed-back zwischen exogenem E_2 und FSH-Abgabe der Hypophyse ist bei den 20 Tage alten (vorpubertär), 35 Tage alten (pubertär) und 56 Tage alten (gerade reif geworden) Tieren festzustellen. Ob den Tieren Dosis I = 0,2 ug/100 g KG, Dosis II = 1,0 ug/100 g KG oder Dosis III = 5,0 ug/100 g Kg exogen zugeführt wurde ist bei diesen Tieren die gleiche inhibitorische E_2-Wirkung vorhanden.

Labrie et al (1978), Dronin et al (1976 a,b), Dronin et Labrie (1976), zeigten durch in vitro Versuche, daß diese Steroid-Wirkung direkt auf der Ebene der Hypophysenzellen erfolgt.

Bei den 90 Tage alten Tieren (Reife) ist eine neue Wirkungsqualität zu sehen: Bei den höheren Dosen II und III erscheint plötzlich ein positiver fedd-back, d.h., daß die Östrogenapplikation zu einem Anstieg der FSH-Konzentration führt. Diese neue Wirkungsqualität ist, wie erwähnt, nicht nur abhängig vom Alter der Tiere sondern auch von der Größe der gegebenen E_2-Dosis. Daraus ist zu schließen, daß E_2 in diesem Alter zwei Wirkungen aufweist. Bei kleinen Dosen wirkt es hemmend auf die FSH-Sekretion, während es bei größeren Dosen fördernd wirkt. Diese Tatsache scheint eine wichtige Rolle in der Steuerung der Ovulation zu spielen.

5.2 Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten verschiedener Altersstufen bezüglich LH

Wiederum zeigt die Gruppe der 20 bis 56-Tage alten Tiere bei der Applikation der kleinsten E_2-Dosis (I) wie bei FSH einen Abfall der LH-Serumkonzentrationen. Im Gegensatz zum FSH kommt es dann aber bei der Gabe der etwas höheren E_2-Dosis (II) zu einem positiven feed-back, beziehungsweise

Wie bei FSH ist bei der mittleren Dosis die größte Abnahme mit 100 % auf 0 ng/ml festzustellen und somit kein meßbares LH mehr vorhanden. Bei der kleinsten und größten Dosis ist eine Abnahme um 69 % bzw. 75 % zu verzeichnen.

4.6 35 Tage alte ovarektomierte Ratten (Pubertät)

4.6.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten (Abb.: 9, 10, 11, 15)

Von der Basisgröße 1360 ng/ml ist bei Dosis I nach 8 Stunden eine Zunahme auf 1660 ng/ml erfolgt. Bei Dosis II auf 1860 ng/ml während bei Dosis III ein Abfall auf 1310 ng/ml zu sehen ist.

Es ist somit bei Dosis I ein positiver feed-back mit 22 % bei Dosis II mit 37 % festzustellen. Bei Substitution der Dosis III konnte in dieser Altersgruppe ein negativer feed-back beobachtet werden.

4.6.2 Serum LH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten (Abb.: 12, 13, 14, 16)

Bei allen drei Konzentrationen ist eine mehr oder weniger starke Abnahme des LH-Serumspiegels zu sehen. Bei Dosis I vom Ausgangswert 400 ng/ml nach acht Stunden auf 180 ng/ml, bei Dosis II auf 315 ng/ml und bei Dosis III auf 105 ng/ml.

Es ist hier bei der größten Dosis die größte Abnahme des Serumhormonspiegels mit 74 % festzustellen, gefolgt von der Dosis I mit 55 % während bei Dosis II nur ein Abfall von 21 % zu vermerken ist.

4.7 56 Tage alte ovarektomierte Ratten (gerade reif geworden

4.7.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten (Abb.: 9, 10, 11, 15)

Bei Gabe von E_2 mit der Dosis I liegt nur ein geringer Anstieg von 1540 ng/ml auf 1610 ng/ml vor. Bei Dosis II ist ein Anstieg von 1540 auf 1550 ng/ml zu verzeichnen. Bei Dosis III ist ein relevanter Abfall von 1540 ng/ml auf 1370 ng/ml zu erkennen.

Man sieht daraus, daß nur bei Dosis III ein negativer feed-back vorhanden ist, während bei Dosis I und II ein positiver feed-back festgestellt werden kann.

4.7.2 Serum LH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten Abb.: 12, 13, 14, 16)

8 Stunden nach Östradiol-Gabe fällt der LH-Serumspiegel bei Dosis I von 300 ng/ml auf 220 ng/ml, bei Dosis II von 300 ng/ml auf 145 ng/ml und bei Dosis III von 300 ng/ml auf 100 ng/ml ab. Bei Betrachtung der prozentualen Werte sieht man bei allen drei Dosen einen Abfall der Serumhormonkonzentration. Der Abfall nimmt von der kleinsten bis zur größten Dosis zu, nämlich bei Dosis I um 26 %, bei Dosis II um 56 % und bei Dosis III um 66 %.

4.8 90 Tage alte ovarektomierte Ratten (Reife)

4.8.1 Serum FSH-Spiegel bei ovarektomierten Ratten Abb.: 9, 10, 11, 15)

Nach Gabe von E_2 der Dosis I steigt der Serum-FSH-Spiegel von 1200 ng/ml auf 2370 ng/ml, also um fast das Doppelte an. Bei Dosis II von 1200 ng/ml auf 1440 ng/ml und bei Dosis III ist ein Anstieg auf 1630 ng/ml festzustellen.

nen Ergebnissen, die eine leichte Stimulation der FSH- und LH-Plasma-Werte bei kastrierten Tieren nach Gabe einer niedrigen Dosis Östrogenbenzoat gefunden hatten. Das gleiche Ergebnis hatten Versuche von Swerdloff und Walsh (1973) und Legan et al. (1973) gefunden. Die im Falle des FSH gewonnenen Ergebnisse stimmen mit denen der genannten Autoren überein, ebenfalls die durch die Gabe einer hohen Östrogendosis erreichte LH-Sekretion.

6. Tabellen und Abbildungen

Ergebnisse

Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten

F S H

Alter der Tiere	Dosis E_2 in ug/ml 100 g Kg	Serum FSH in ug/ml	Standard-abweichung	nach 8 Std. Serum FSH in ug/ml	Standard-abweichung	Veränderung in v.Hundert
20 Tg	0,2	800	75	320	60	- 91
35 Tg	0,2	150	20	0	0,5	- 100
56 Tg	0,2	110	5	10	2	- 90
90 Tg	0,2	100	13	13	5	- 87
20 Tg	1,0	800	75	635	105	- 21
35 Tg	1,0	150	20	25	7	- 83
56 Tg	1,0	110	5	7	2	- 93
90 Tg	1,0	100	13	240	25	140
20 Tg	5,0	800	75	610	100	- 24
35 Tg	5,0	150	20	0	0,4	- 100
56 Tg	5,0	110	5	58	10	- 42
90 Tg	5,0	100	13	108	10	8

Tabelle 1

Ergebnisse

Intakte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten

LH

Alter der Tiere	Dosis E_2 in ug/ml 100 g KG	Serum LH in ug/ml	Standard-abweichung	nach 8 Std. Serum LH in ug/ml	Standard-abweichung	Veränderung in v.Hundert
20 Tg	0,2	60	15	5	0,5	- 91
35 Tg	0,2	30	9	11	2	- 60
56 Tg	0,2	10	6	8	3	- 20
90 Tg	0,2	6	4	15	3	150
20 Tg	1,0	60	15	150	40	150
35 Tg	1,0	30	9	35	5	16
56 Tg	1,0	10	6	0	0	- 100
90 Tg	1,0	6	4	90	6	1400
20 Tg	5,0	60	15	20	5	- 66
35 Tg	5,0	30	9	5	0,8	- 83
56 Tg	5,0	10	6	1,5	0,5	- 85
90 Tg	5,0	6	4	3	1	- 50

Tabelle 2

Ergebnisse

Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten
(p o o l - W e r t e)

F S H

Alter der Tiere	Dosis E_2 in ug/ml 100 g KG	Serum FSH in ug/ml	nach 8 Std. Serum FSH in ug/ml	Veränderung in v. Hundert
20 Tg	0,2	2500	1550	- 38
35 Tg	0,2	1360	1660	+ 22
56 Tg	0,2	1540	1610	+ 5
90 Tg	0,2	1200	2370	+ 97
20 Tg	1,0	2500	600	- 76
35 Tg	1,0	1360	1860	+ 37
56 Tg	1,0	1540	1550	+ 1
90 Tg	1,0	1200	1440	+ 20
20 Tg	5,0	2500	1700	- 32
35 Tg	5,0	1360	1310	- 4
56 Tg	5,0	1540	1370	- 11
90 Tg	5,0	1200	1630	+ 36

Tabelle 3

Ergebnisse

Ovarektomierte und mit E_2 gespritzte weibliche Ratten
(p o o l - W e r t e)

L H

Alter der Tiere	Dosis E_2 in ug/ml 100 g KG	Serum LH in ug/ml	nach 8 Std. Serum LH in ug/ml	Veränderung in v. Hundert
20 Tg	0,2	550	170	- 69
35 Tg	0,2	400	180	- 53
56 Tg	0,2	300	220	- 26
90 Tg	0,2	160	120	- 25
20 Tg	1,0	550	0	- 100
35 Tg	1,0	400	315	- 21
56 Tg	1,0	300	145	- 51
90 Tg	1,0	160	100	- 38
20 Tg	5,0	550	140	- 75
35 Tg	5,0	400	105	- 74
56 Tg	5,0	300	100	- 66
90 Tg	5,0	160	90	- 44

Tabelle 4

Verhältnis FSH zu LH bei intakten und mit E_2 gespritzten weiblichen Ratten verschiedener Altersstufen

	intakt	+ E_2 nach 8 Std.
20 Tage D I	13,3	64,00
35 Tage D I	5,0	0,00
56 Tage D I	11,0	1,25
90 Tage D I	16,6	0,86
20 Tage D II	13,3	4,23
35 Tage D II	5,0	0,71
56 Tage D II	11,0	7,00
90 Tage D II	16,6	2,66
20 Tage D III	13,3	30,50
35 Tage D III	5,0	0,00
56 Tage D III	11,0	38,60
90 Tage D III	16,6	36,00

Tabelle 5

Verhältnis FSH zu LH bei ovarektomierten und mit E_2 gespritzten weiblichen Ratten verschiedener Altersstufen

	ovarektomiert	+ E_2 nach 8 Std.
20 Tage D I	4,5	9,11
35 Tage D I	3,4	9,22
56 Tage D I	5,1	7,32
90 Tage D I	7,5	19,75
20 Tage D II	4,5	0,00
35 Tage D II	3,4	5,90
56 Tage D II	5,1	10,60
90 Tage D II	7,5	14,40
20 Tage D III	4,5	12,10
35 Tage D III	3,4	12,40
56 Tage D III	5,1	13,70
90 Tage D III	7,5	18,10

Tabelle 6

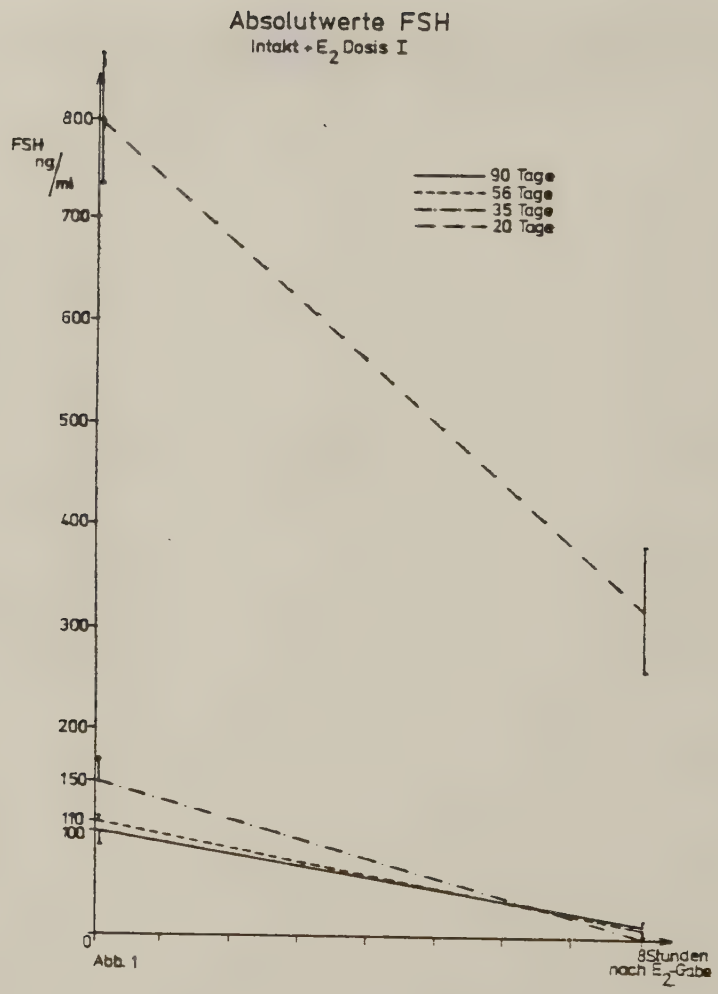


Abb.1 Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis I = 0,2 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

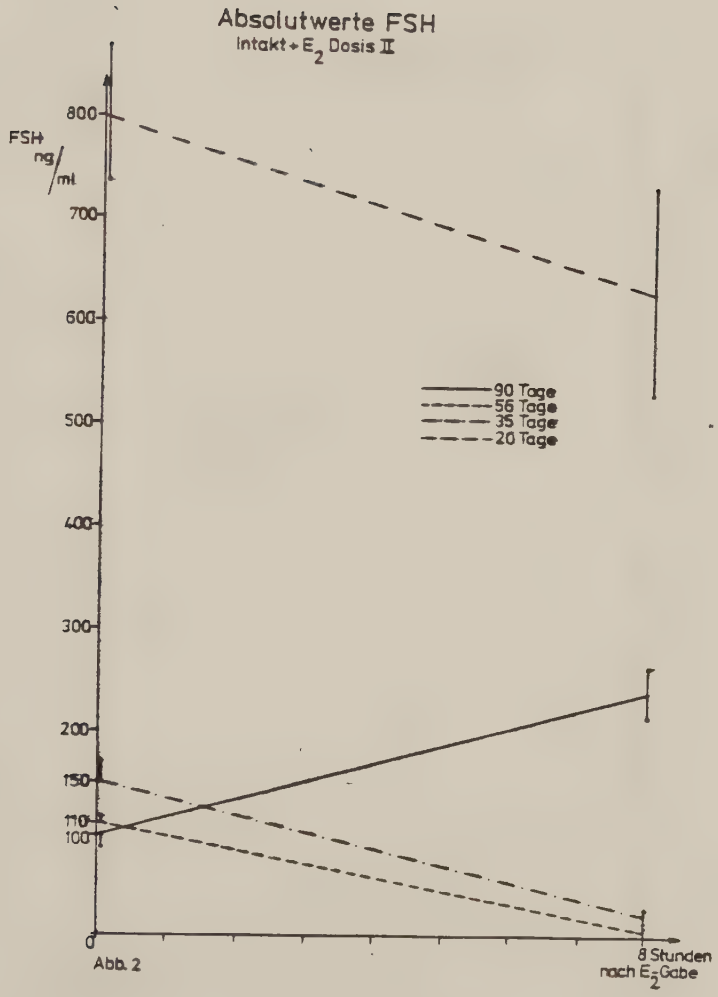


Abb.2 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis II = 1,0 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

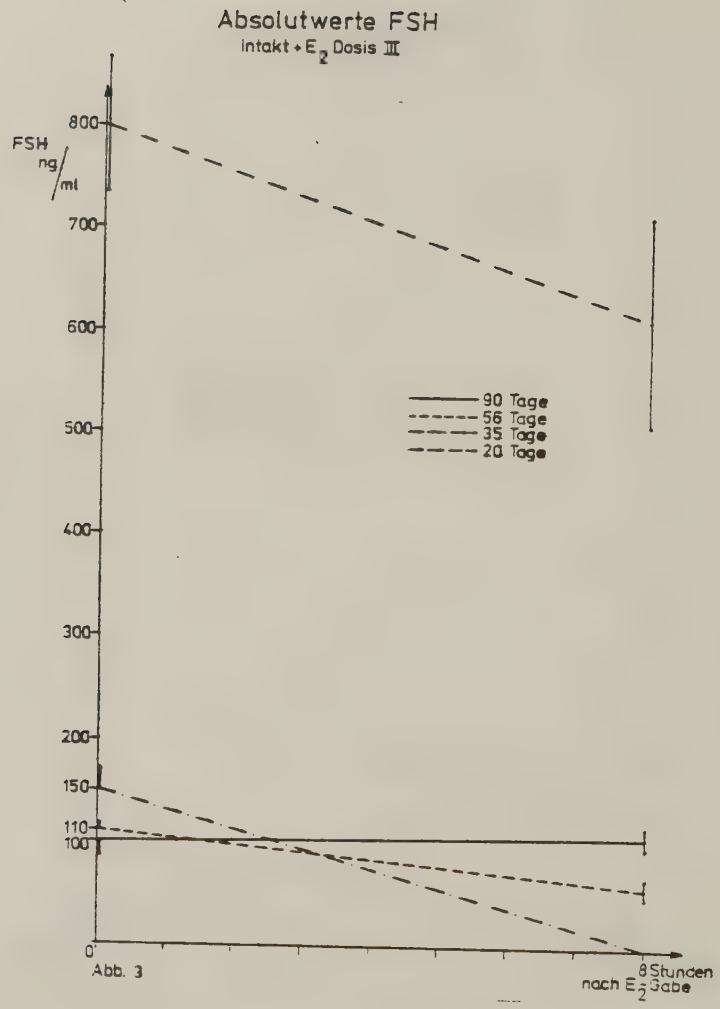


Abb.3 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis III = 5,0 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

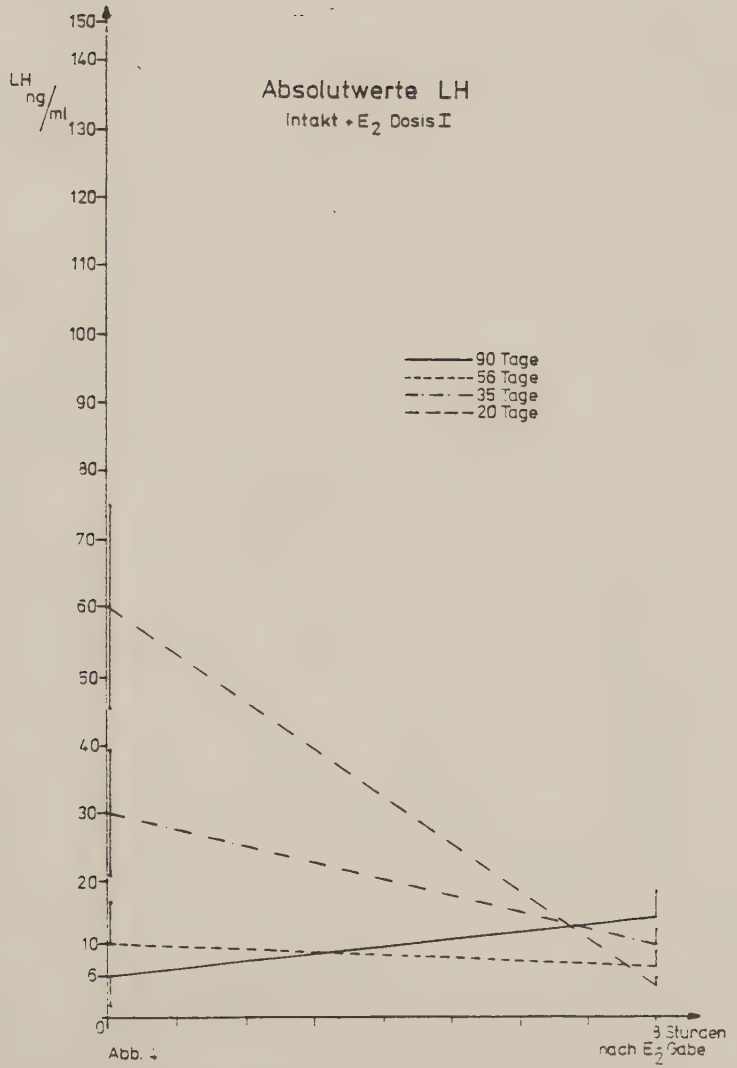


Abb.4 Anstieg bzw. Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis I = 0,2 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

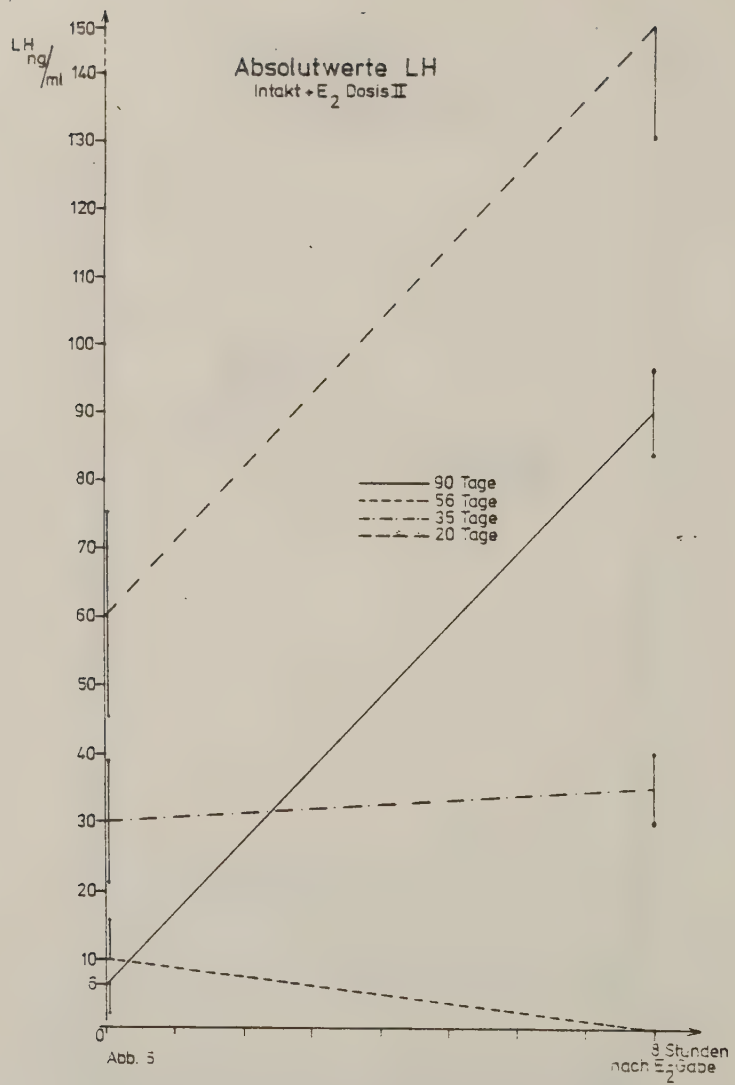


Abb.5 Anstieg bzw. Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis II = 1,0 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

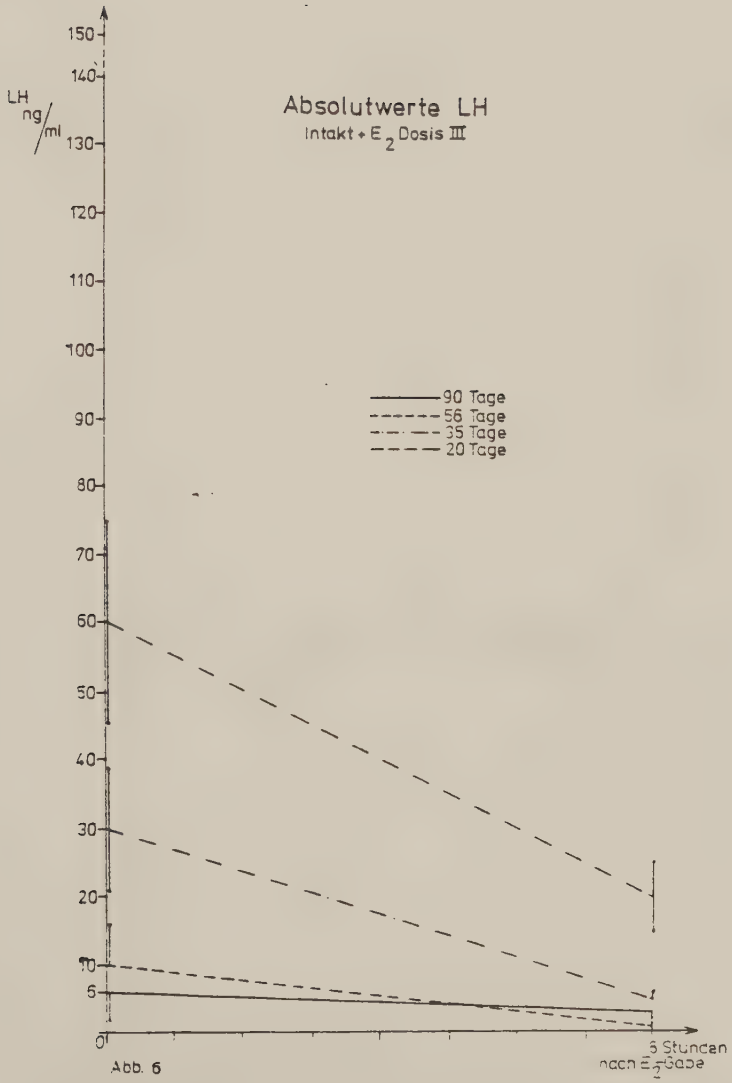


Abb.6 Anstieg bzw. Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis III = 5,0 ug/100 g KG bei intakten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

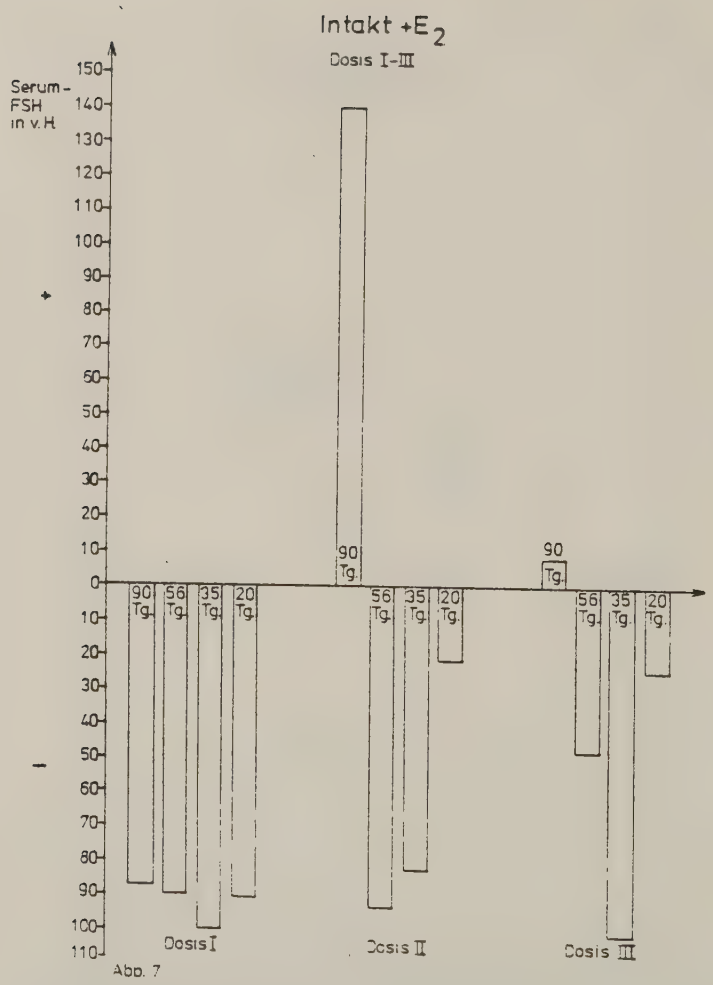


Abb.7 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen bei intakten Tieren mit exogen zugeführtem E_2 (Dosis I bis III) in Prozenten

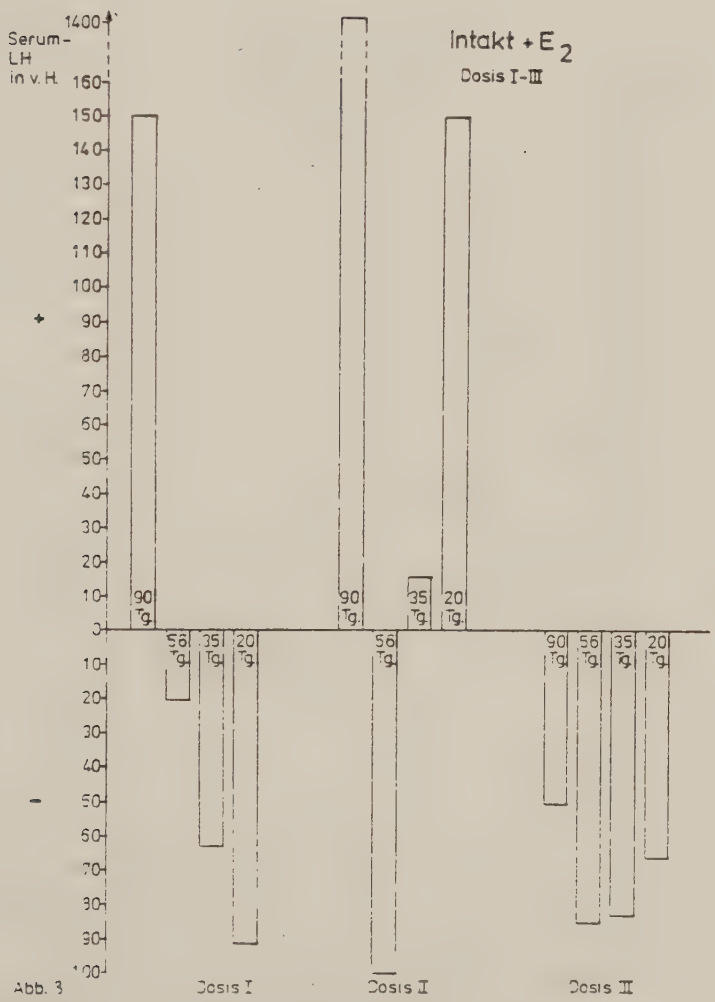


Abb.8 Anstieg bzw. Abfall der LH-Serumkonzentrationen bei intakten Tieren mit exogen zugeführtem E_2 (Dosis I bis III) in Prozenten

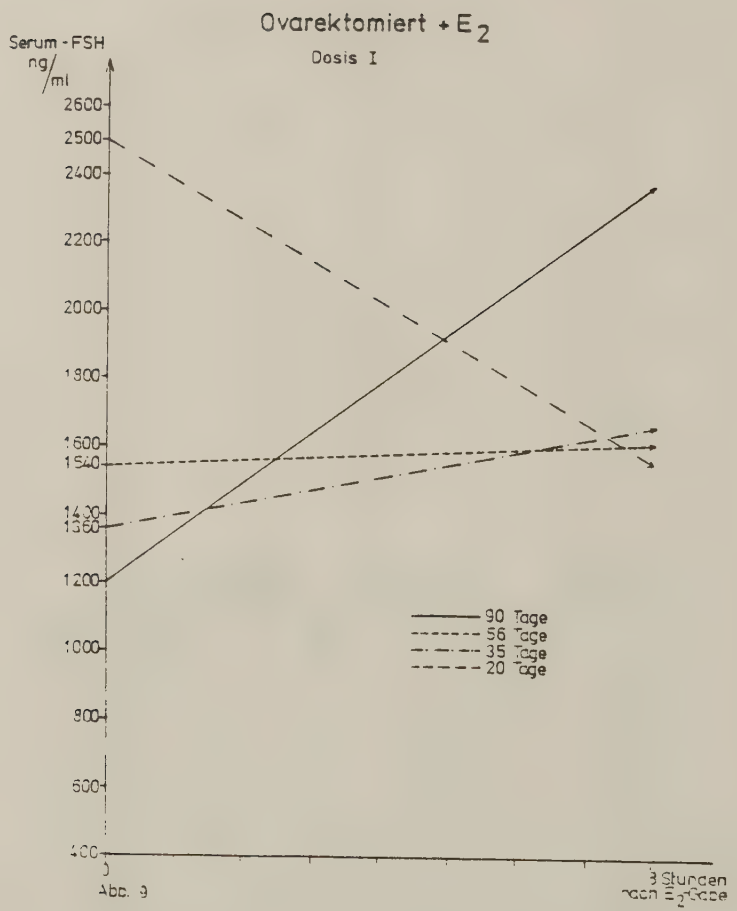


Abb. 9

Abb.9 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis I = 0,2 ug/100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

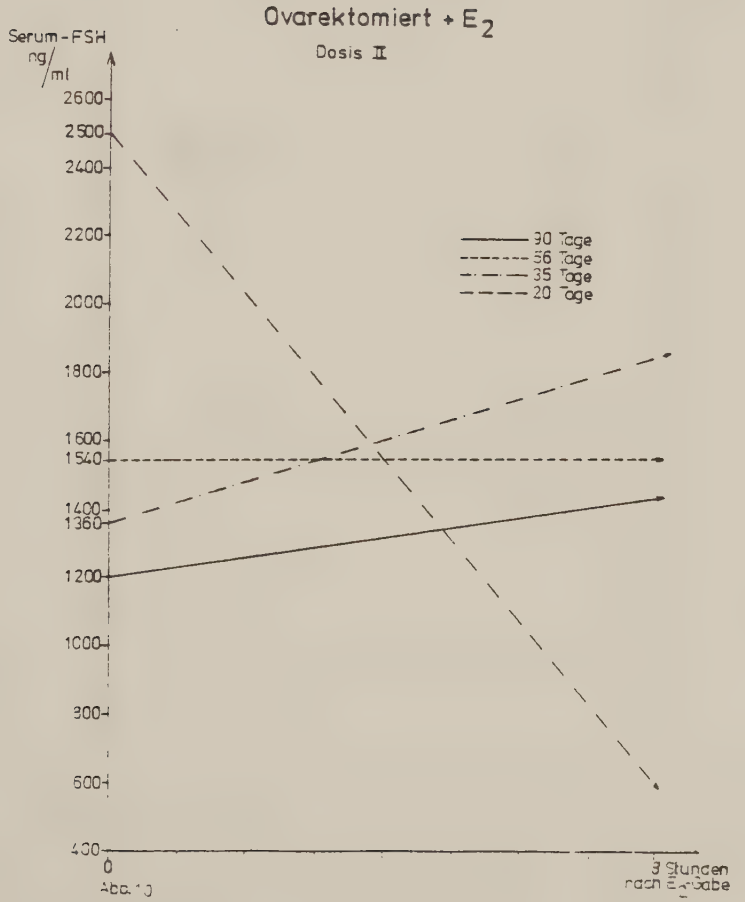


Abb.10 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis II = 1,0 ug/100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

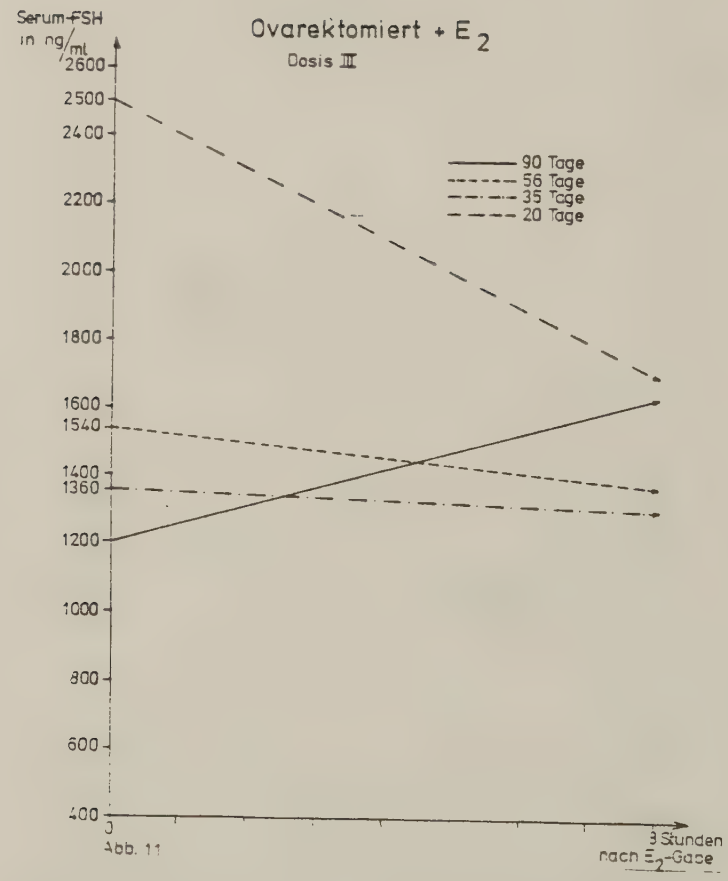


Abb.11 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis III = 5,0 ug/100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

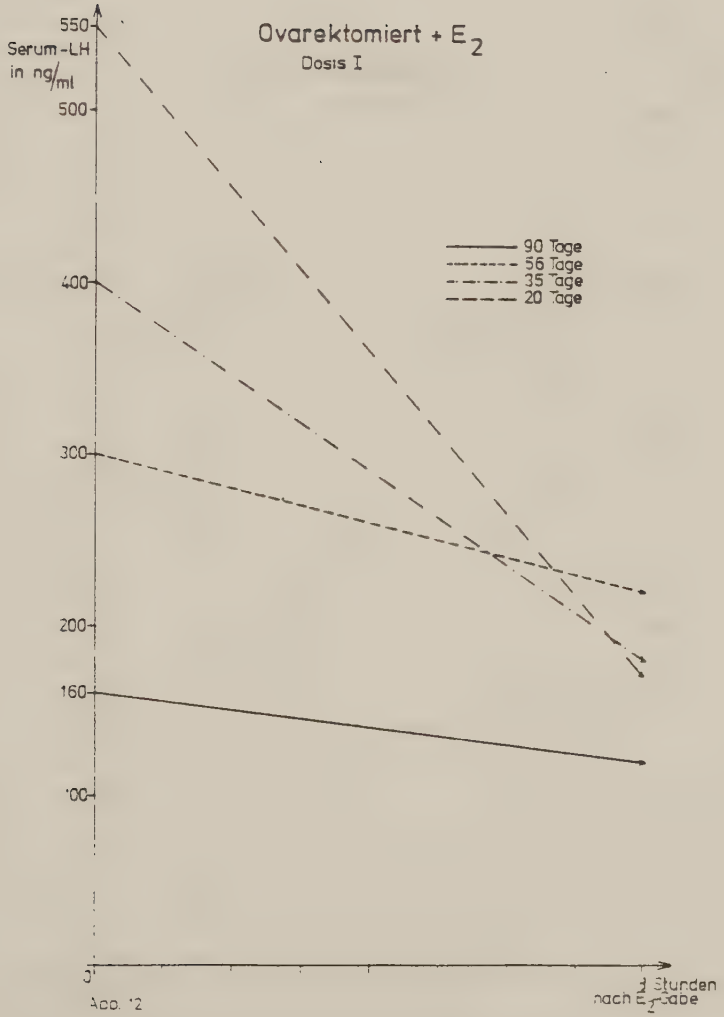


Abb.12 Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis I = 0,2 ug/ 100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

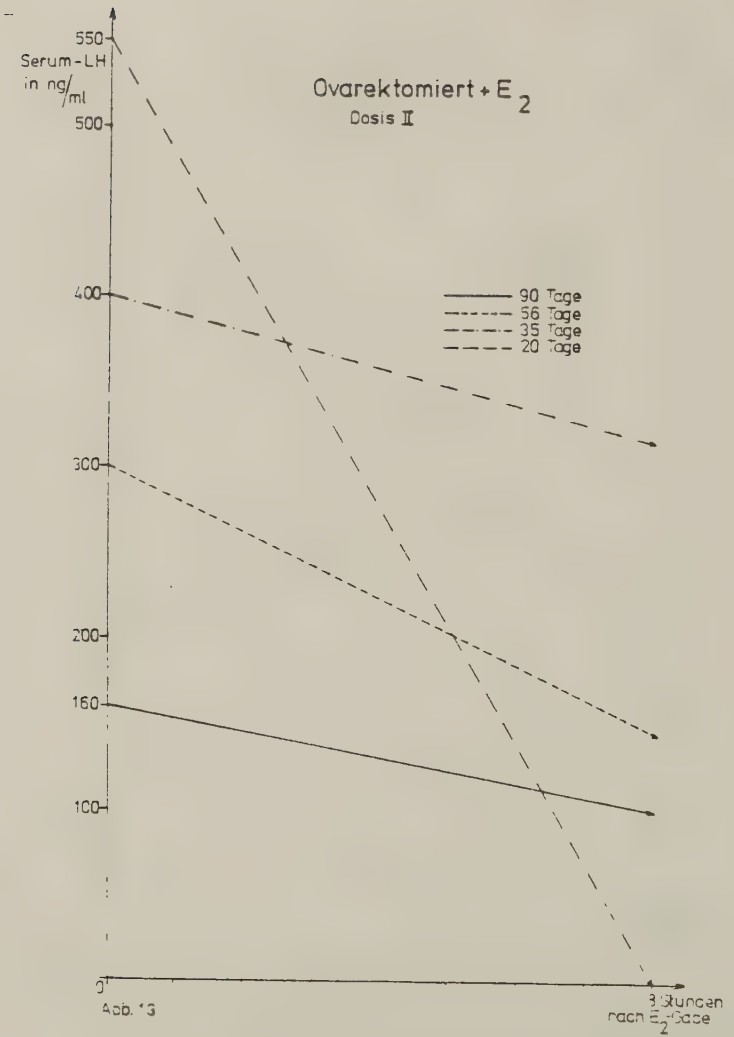


Abb.13 Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis II = 1,0 ug/100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

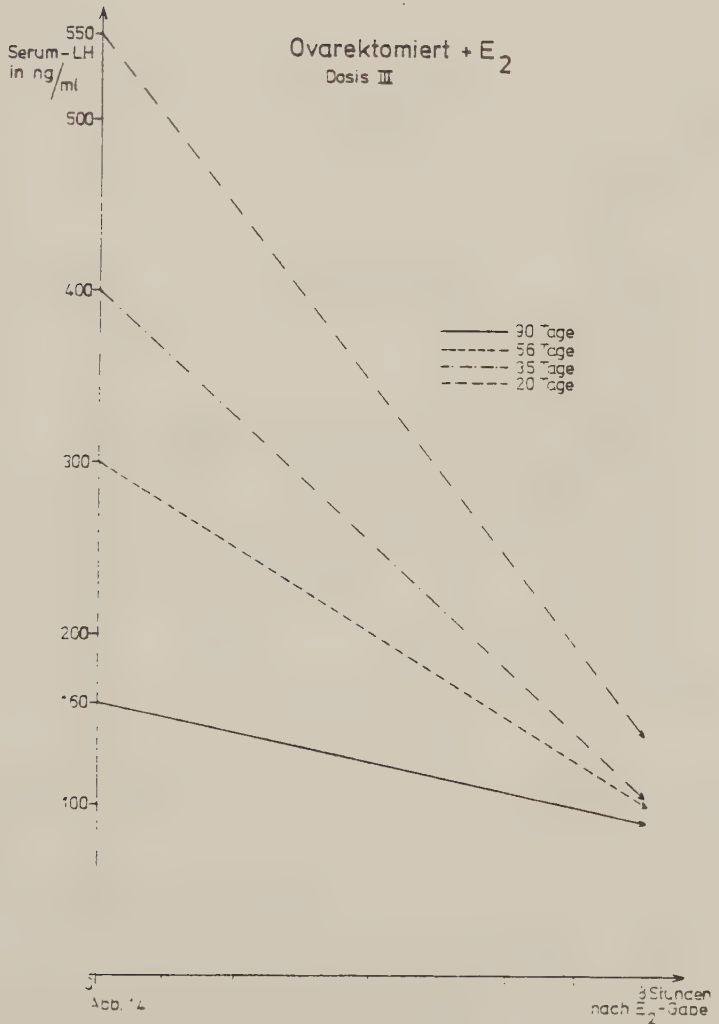


Abb.14 Abfall der LH-Serumkonzentrationen 8 Stunden nach E_2-Gabe der Dosis III = 5,0 ug/100 g KG bei ovarektomierten Tieren der verschiedenen Altersgruppen

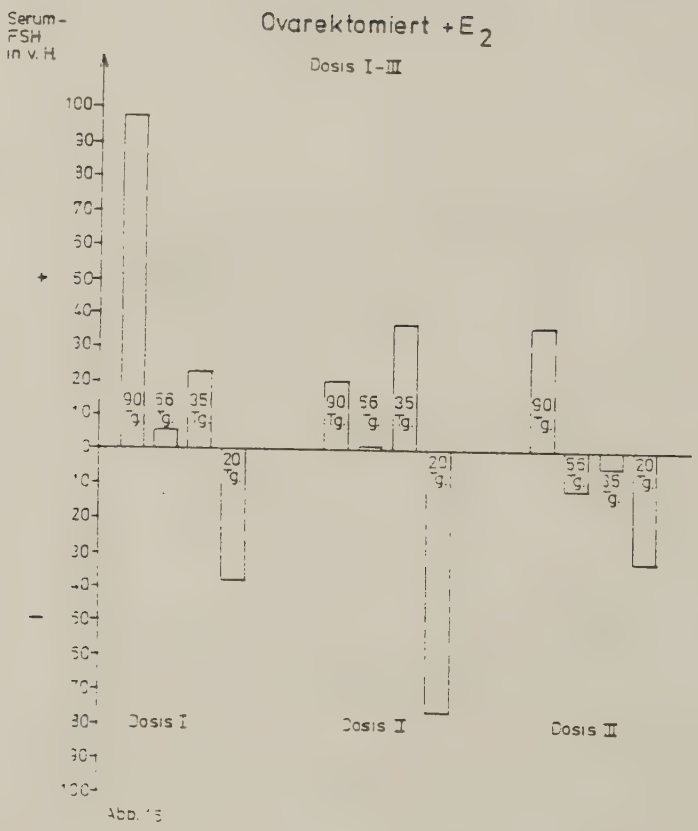


Abb.15 Anstieg bzw. Abfall der FSH-Serumkonzentrationen bei ovarektomierten Tieren mit exogen zugeführtem E_2 (Dosis I bis III) in Prozenten

Abb. 15

Abb.16 Anstieg bzw. Abfall der LH-Serumkonzentrationen bei ovarektomierten Tieren mit exogen zugeführtem E_2 (Dosis I bis III) in Prozenten

LITERATURVERZEICHNIS

ANDREWS, W.W., OJEDA, S.R. (1977):
On the Feedback-Actions of Estrogen on Gonadotropin and prolactin Release in Infantile female Rats

Endocrinology 101: 1517

ANDREWS, W.W., OJEDA, S.R. (1977):
Activation of Estrous Behavior in Ovariektomized Rats by intracerebral Implants of Estradiol Benzoate

Endocrinology 101: 1717

CHRITCHLOW, V. and BAR-SELA, M.W., in:
Eds.: Martini, L. and Ganong, W.F.
Control of the Onset of Puberty

Neuroendocrinology vol II, Academic Press, New York 1967, p. 101

DOHLER, K.D., WUTTKE, W. (1972):
Changes with Age in Levels of Serum Gonadotropins Prolactin and Gonadal Steroids in Prepuberal Male and Female Rats

Endocrinology 97: 898

DONOVAN, B.R., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J. (1959):
The hypothalamus and sexual maturation in the rat

J. Physiol. 147: 78

DROUIN, J., DE LÉAN, A., RAINVILLE, D., LACHANCE R., and LABRIE, E. (1976 a):
Characteristics of the interaction between TRH and somatostatin for thyrotropin and prolactin release

Endocrinology 98: 514

DROUIN, J., LAGACÉ, L. and LABRIE, F. (1976 b):
Estradiol-induced increase of the LH responsiveness to LH releasing hormone (LHRH) in rat anterior pituitary

Endocrinology 99: 1477

DROUIN, J., LABRIE, F. (1976):
Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture

Endocrinology 98: 1528

GOLDBERG, R.L., VAITUKAITIS, J.L. and ROOS, G.T. (1972):
Estrogen and Follicle Stimulating Hormone, Interactions on Follicle Growth in Rats

Endocrinology 90: 1492

GRUMBACH, M.M, (1974) in:
Control of onset of Puberty
Eds.: Grumbach, M.W., G.D. Grave and F.E. Mayer, Wiley & Sons, New York

GUPTA, D., EICHNER, M. (1979):
Interaction of gonadal steroids, gonadotropins and gonadotropin releasing Hormons in sexual maturation

Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 11 579

GUPTA, D., (1975) in:
Hypothalamic Hormones - Structure, Synthesis and Biological Activity
Eds.: D. Gupta and W. Voelter
Verlag Chemie, Weinheim

GUPTA, D., in:
Hypothalamic Hormones Chemistry, Physiology and Clinical Applications
Eds.: D. Gupta and W. Voelter
Verlag Chemie, Weinheim

GUPTA, D., (1976):
Hypothalamic control of the mammalian sexual maturation

Lecture, Vienna

GUPTA, D., ROHR, M. und EICHNER, M., (1980) in:
Hormone im Kindesalter
Eds.: Gupta, D.
Schattauer Verlag Stuttgart-New York, S. 1 ff

HARRIS, G.W., (1955):
Neural Control of the Pituitary Gland

Arnold, London

HIPP, R.,(1981):
Die Auswirkung der Ovarektomie auf den Serumgonadotropinspiegel in der Zeit von 10 Tagen post operationem in Abhängigkeit vom sexuellen Reifestadium bei weiblichen Ratten

Inaugural Dissertation, Universität Tübingen

HOHLWEG, W., JUNKMANN, K., (1932):
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens

Klin. Wochenschr. 11: 321

KELLER, E., FRIEDRICH, E. und SCHINDLER, A.E., (1980) in:
Hormone im Kindesalter
Ed.: Gupta, D.
Schattauer Verlag Stuttgart-New York,
S. 158 ff

LABHSETWAR, A.P., (1969):
Age-Dependent Change in the pituitary-Gonadal Relationship

J. Reprod. Fert. 20: 21 - 28

LABRIE et al (1978):
Intractions between LH-RH, Sex Steroids and "Inhibin" in the control of LH and FSH Secretion

Internat.Journal of Andrology, Supp. 1,2

LEGAN, S.J., GAY, V.L. und MIDGLEY, A.R. jr. (1973):
LH release following steroid administration in ovarectomized rats

Endocrinology 93: 781

MERK, F.B., BOTTICELLI, C.R. and ALBRIGHT, J.T., (1972):
An Intercellular Response to Estrogen by Granulosa Cells in the Rat Ovary; an Electron Microscope Study

Endocrinology 90: 992

NEGRO-VILAR, A., OJEDA, S.R. and Mc CANN, S.M, (1973):
Evidence for Changes in Sensitivity to Testosterone Negative Feedback on Gonadotropin Release during Sexual Development in the Male Rat

Endocrinology 93: 729

NEILL, J.D., SMITH, M.S., (1973):
Pituitary-Ovarian Interrelationships

Fed.Proc., Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 32: 307

NUNEZ, E.F., ENGERMANN, C., BENASSAYAG, L., u.a. (1971):
Identification et purification préliminaire de la foetoprotéine liant les oestrogénes dans le sérum de rats nouveau-nés

C.R. Acad. Sci (Paris) 273: 831

OJEDA, S.R., WHEATON, J.E., JAMESON, H.E. and Mc CANN, S.M., (1976):
The Onset of Puberty in the Female Rat: Changes in Plasma Prolactin, Gonadotropins, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH), and Hypothalamic LHRH Content

Endocrinology 98: 630

SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN, A.I. (1967):
Purification and in vivo and vitro studies with porcine luteinizing hormones - releasing factor

Endocrinology 81: 77

SCHALLY, A.V., SAITO, R., ARIMURA, A., SAWANO, S., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN A.I., (1967):
Purification and in vitro and in vivo studies with porcine hypothalamic follicle -stimulating hormone - releasing factor

Endocrinology 81: 882

SCHALLY, A.V., MÜLLER, E.E. and SAVANO, S., (1968):
Effect of procine growth hormone - releasing factor on the release of synthesis of growth hormone in vitro

Endocrinology 82: 271

SCHALLY, A.V., ARIMURA, S., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SAWANO, S. and REDDING, R.W., (1968):
Hypothalamic neurohormones regulation anterior pituitary function

recent Progr. Hormone Res. 24: 497

SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KOWERS, C.Y., WAKABAYSHI, I., KASTIN, A.J., REDDING, T.W., MITTLER, J.C., NAIR, R.M.G., PIZZOLATO, P. and SEGAL, A.J., (1970):
Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin

J. Clin. Endocrin. 31: 291

TAUBERT, H.-D., (1976) in:
Gynäkologie und Geburtshilfe
Ed.: Schmidt-Matthiesen, H.
Schattauer Verlag Stuttgart-New-York

SMITH, E.A., DAVIDSON, J.M. (1967):
Amer.J. Phyiol 212: 1385

SWERDLOFF, R.S., WALSH, P.C., and ODELL, W.D, (1972):
Steroids 20: 13

STEELE, R.W., WEISZ, J., (1974):
Changes in Sensitivity of the Estradiol - LH Feedback System with Puberty in the Female Rat

Endocrinology 95: 513

STEELE, R.W., (1977):
Role of the Ovaries in Maturation of the Estradiol LH negative Feedback-System of Pubertal Rat

Endocrinology 101: 587

SWERDLOFF, R.S., and WALSCH, P.C., (1973):
Testosterone and estradiol suppression of LH and FSH in adult male rats:
duration of castration, duration of treatment and combined treatment

Acta endocr. (KBN) 73,11

TURNER, J.W. jr., (1973):
Effect of Hypothalamic Laesions and Androgen on Plasma LH Levels in Castrated Male Gerbils

Endocrinology 92: 227

VANDERHEYDEN, J., HOET, J.J., De HERTOGH, EKKA, R.E., (1976):
Endocrinology 87: 874

WALZ, S., (1982):
Die Altersabhängige Wirkung von LH-RH bei intakten, ovarektomierten und östrogen-substituierten weiblichen Ratten während der sexuellen Reifung

Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen

WUTTKE? W.: (1977):
Positiv Feedback-Action of Estradiol on Gonadotropin release in 15 days old female rats

Acta endocrinologica 86: 263 - 272

YEN, S.C., JAFFE, R.B., (1978):
Reproductive Endocrinology
The Human Menstrual Cycle

East Baune: Holt-Saunders

Lebenslauf

Am 25. Februar 1941 wurde ich, Klaus Kern, als Sohn des Wilhelm Kern, Zollinspektor (gefallen 1945) und dessen Ehefrau Anna Kern geb. Krug, Hausfrau (verstorben 1970) in Tübingen geboren.

Von 1948 bis 1959 besuchte ich die Grundschule und die Mittelschule in Tübingen, welche ich mit der Mittleren Reife 1959 abschloß. Ab Mai 1959 absolvierte ich eine zweijährige Ausbildung für den mittleren Dienst beim Finanzamt Reutlingen mit Abschluß im April 1961. Von Mai 1961 bis 31. Januar 1965 war ich beim Finanzamt Neuenbürg (Schwarzwald) tätig. Die Zeit wurde vom 1. April 1962 bis 30. September 1963 durch Ableistung meines Grundwehrdienstes unterbrochen. Ab 1. Februar 1965 bis März 1974 war ich beim Finanzamt Tübingen tätig. Im September 1966 heiratete ich die Sekretärin Renate Schneck. Ab März 1974 mußte ich wegen des Besuchs des Abendgymnasiums mein Beamtenverhältnis kündigen. Die Reifeprüfung legte ich erfolgreich im Mai 1975 ab.

Ab dem Wintersemester 1975/76 belegte ich als Hauptfach Empirische Kulturwissenschaften und als Nebenfächer Soziologie und Politologie an der Universität Tübingen. Ab Sommersemester 1976 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen und legte nach dem 4. Semester die ärztliche Vorprüfung und am 22. März 1979 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit Erfolg ab. Im Sommer 1979 begann ich mit den Versuchen für meine Dissertation. Am 20. März 1981 legte ich nach dem 10. Semester den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit Erfolg ab, mein Staatsexamen am 26. April 1982. Seit April 1981 bis 21. März 1982 war ich Internatsstudent im Städt. Krankenhaus Sindelfingen.